

NEUE METHODEN ZUM STUDIUM DER tRNS BINDUNG UND EINIGER AKTIVITÄTEN DES PEPTIDYLTRANSFERASE- ZENTRUMS IN ESCHERICHIA COLI RIBOSOMEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Beate Ulbrich
aus Berlin

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

NEUE METHODEN ZUM
STUDIUM DER tRNS BINDUNG
UND EINIGER AKTIVITÄTEN
DES PEPTIDYLTRANSFERASE-
ZENTRUMS IN ESCHERICHIA
COLI RIBOSOMEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des Fachbereichs Biologie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Beate Ulbrich

aus Berlin

1. Referent: Prof. Dr. H.-G. Wittmann

2. Referent: Prof. Dr. E.-R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1976



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1. Material	4
2.2. Methoden	5
2.2.1. Isolierung von S30, 70S, S150 und Untereinheiten	5
2.2.2. Präparation von LiCl core- Partikeln und Rekonstitution	6
2.2.3. Herstellung von AA-tRNS und Fragmentation	8
2.2.4. <u>In vitro</u> Proteinsynthese- Systeme	11
2.2.5. Bindung von tRNS, Fragmenten und Antibiotika	14
2.2.6. Peptidyltransferase-Tests ..	19
2.2.7. Affinitätsmarkierung der P- Region	20
2.2.8. Analyse von Peptiden	22
3. Ergebnisse	25
3.1. Entwicklung und Charakterisierung der Methoden	25
3.1.1. Bindung beladener tRNS an 70S und Untereinheiten	25

	Seite
3.1.2. tRNS-Peptidyltransferase- Test	35
3.1.3. tRNS-Puromycin-Test	42
3.1.4. Fragmentbindung an 50S Untereinheiten	46
3.1.5. Affinitätsmarkierung mit CACCA-(^{14}C)-Leu-Ac-Br	66
3.2. Analyse der Wirkungsweise von Pleu- romutilin	67
3.2.1. <u>In vitro</u> Proteinsynthese ...	68
3.2.2. tRNS Bindung	71
3.2.3. tRNS-Puromycin-Test und Frag- ment-Test	77
3.2.4. Fragmentbindung	79
3.2.5. Konkurrenzversuche mit Chlor- amphenicol und Puromycin ...	82
4. Diskussion	87
Zusammenfassung	105
Abkürzungen	108
Literaturverzeichnis	109
Danksagung	119
Lebenslauf	120

1.

Einleitung

Die Übersetzung der in der DNS gespeicherten Informationen in Proteine erfordert das Zusammenwirken einer Vielzahl von Komponenten. Nach der Umschreibung von DNS - Information in m-RNS erfüllen die Ribosomen eine wichtige Funktion bei der Übersetzung (Translation) der Nukleinsäuresequenz.

Am genauesten sind die Ribosomen des Bakteriums *Escherichia coli* untersucht. Wie alle prokaryotischen Ribosomen haben sie einen Sedimentationskoeffizienten von 70S und zerfallen unter geeigneten Bedingungen reversibel in zwei Untereinheiten, die bei 30S bzw. 50S sedimentieren. Aufgebaut werden 70S Ribosomen aus RNS - Molekülen und verschiedenen, meist basischen Proteinen. Die 30S Untereinheit enthält ein 16S RNS - Molekül und 21 Proteine, während die große 50S Untereinheit aus 23S RNS, 5S RNS und 34 Proteine zusammengesetzt ist. Beide Untereinheiten können in vitro aus ihren isolierten Bestandteilen rekonstituiert werden (Traub und Nomura, 1968; Nierhaus und Dohme, 1974).

Die Rekonstitution, die spezifische Wirkung von Antibiotika auf ribosomale Teilfunktionen, die Reaktion mit proteinspezifischen Antikörpern und die Affinitätsmarkierung erlauben eine Korrelation der riboso-

malen Strukturelemente mit den vom Ribosom ausgeübten Funktionen. Die 30S Untereinheit enthält Bindungsstellen für Initiationsfaktoren, Initiator-tRNS und m-RNS. Alle diese Komponenten lagern sich zu einem Initiationskomplex zusammen. Anschließend wird die 50S Untereinheit gebunden und der 70S - Initiationskomplex gebildet. Auf der großen ribosomalen Untereinheit liegen die wichtigen enzymatischen Zentren, die die Peptidbindung und, zusammen mit Faktoren, die GTP-Spaltung katalysieren.

Das Peptidyltransferase-Zentrum, an dessen Aufbau verschiedene Proteine und die 23S RNS beteiligt sind, benötigt zwei Substrate: die Peptidyl-tRNS und die Aminoacyl-tRNS, auf die die Peptidkette übertragen wird. Dieser Peptidtransfer erfordert keine zusätzliche Energie. Die beiden Bindungsstellen für die tRNS werden durch die Reaktionsfähigkeit der an sie gebundenen Substrate mit dem Aminoacyl-tRNS Analogon Puromycin unterschieden. Hierbei reagiert die in der P-Region gebundene Peptidyl-tRNS mit Puromycin, während die Aminosäure oder das Peptid von einer in der A-Region gebundenen tRNS nicht auf das ebenfalls in der A-Region bindende Antibiotikum übertragen werden kann.

Es ist gezeigt worden, daß beide Bindungsstellen in der Lage sind, das 3'-Ende einer Aminoacyl- bzw. Peptidyl-tRNS zu binden (Monro und Marcker, 1967; Pest-

ka, 1969; Lessard und Pestka, 1972), und daß diese tRNS-Fragmente als Peptiddonor und -akzeptor fungieren können (Monro und Marcker, 1967; Ringer und Chladek, 1974). Außer für diese Substrate bietet das Peptidyltransferase-Zentrum auch Bindungsstellen für andere Moleküle, z.B. Antibiotika, die Funktionen des enzymatischen Zentrums hemmen.

Das wesentliche Testsystem für das Peptidyltransferase-Zentrum ist die Fragmentreaktion (Monro, 1971). Mindestens drei Aktivitäten des Peptidyltransferase-Zentrums sind für den Test nötig: Donorsubstratbindung in die P-Region, Akzeptorsubstratbindung in die A-Region und die enzymatische Bildung der Peptidbindung.

Zur näheren Analyse dieser Teilfunktionen, sowie ihrer Wechselwirkungen werden in dieser Arbeit neue Methoden vorgestellt. Mit ihrer Hilfe wurden die spezifische Bindung verschiedener Substrate in A-Region bzw. P-Region und die Wirkungsweise eines Antibiotikums (Pleuromutilin) untersucht.

2.

Material und Methoden

2.1.

Material

Borsäuregel war von Ega-Chemie (Nr. 18, 445-4), Bio-gel P2 (200 - 400 mesh) von Bio-Rad Laboratories, Sephadex G50 (fine) und G100 von Pharmacia, Upsala. Dünnschichtfolien Polygram CEL 300 wurden von Macherey, Nagel und Co. bezogen.

Instagel (Kat.-Nr. 6003063), PPO (2,5-Diphenyloxazol, Kat.-Nr. 600205), POPOP (1,4-bis2-(5-Phenyloxazolyl)benzene, Kat.-Nr. 6002032) und Soluene 350 (Kat.-Nr. 6003038) stammten von Packard, Frankfurt/M.

Poly(U), Poly(A), Poly(C), tRNS (MRE 600), tRNS^{Phe} (MRE 600) und RNase T1 wurden bei Boehringer, Mannheim gekauft.

DNase 1 (EC13.1.4.5.) und Puromycin waren von Serva, Heidelberg, alle anderen Chemikalien von Merck, Darmstadt.

Dialysemembranen wurden von Serva (Visking Kat.-Nr. 44110) und Schleicher und Schüll (AC 64, Zelluloseacetat) bezogen.

Filter waren von Schleicher und Schüll (Glasfilter Nr. 6, 23 mm) und Sartorius (Typ SM 11306, 0,45µ).

(^3H)-Puromycindihydrochlorid (spez. Akt. 3.7 Ci/mMol), (^3H)-Leucin (53 Ci/mMol), (^{14}C)-Phenylalanin (522 mCi/mMol), (^3H)-Phenylalanin (15 Ci/mMol), (^3H)-Aminosäuremix und (^3H)-GTP (11 Ci/mMol) wurden von Amer-sham, England gekauft.

(^{14}C)-Chloramphenicol (4.9 mCi/mMol) und (^{14}C)-Leu-cin (325 mCi/mMol) stammten von New England Nuclear.

Pleuromutilin war ein Geschenk von Dr. G. Högenauer, Sandoz-Forschungsinstitut, Wien.

2.2.

Methoden

2.2.1.

Isolierung von S30, S150, 70S und Untereinheiten

E. coli K12(A19) Met⁻ RNase 1⁻ Gesteland, 1966) wurden in KPO_4 -Puffer (10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.5, 1 mM MgCl_2 , 6 mM MÄ) mit 5µg DNase 1 per ml gewaschen. Die Zellen wurden mit zwei Volumina Alcoa aufgebrochen und mit zwei Volumina KPO_4 -Puffer homogenisiert. Alcoa und Zelltrümmer wurden durch zweimaliges Zentrifugieren bei 30 000g entfernt. Der Rohextrakt (S30) wurde ausgiebig gegen KPO_4 -Puffer dialysiert. 70S Ribosomen und Enzymfraktion (S150) wurden aus dem S30 durch Ultrazentrifugation (5 Std./176 000g) gewonnen. Der S150 Überstand wurde gegen S-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgAc, 6 mM MÄ) dialysiert und erneut zentrifugiert (5 Std./176 000g). Die oberen 2/3

des Überstandes wurden als Enzymfraktion verwendet. 7000 A_{260} Einheiten 70S wurden per Lauf in einem BXV Zonenrotor in 30S und 50S Untereinheiten aufgetrennt. Die gewünschten Fraktionen wurden jeweils gesammelt, die Untereinheiten durch Zentrifugation (16 Std./176 000g) sedimentiert und in TMNSH-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 60 mM NH_4Cl , 6 mM MÄ) resuspendiert. Alle Fraktionen wurden bei $-80^\circ C$ gelagert.

2.2.2.

Präparation von LiCl-core-Partikeln und Rekonstitution

2.2.2.1.

Herstellung von core-Partikeln und Protein - RNS Trennung

Die Herstellung von Partikeln mit vermindertem Proteingehalt folgte den Angaben von Homann und Nierhaus (1971). 30S und 50S Untereinheiten wurden nach Hitzeaktivierung (25 Min./ $37^\circ C$) in TM-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgAc-EDTA) mit verschiedenen LiCl-Konzentrationen inkubiert (5 Std./ $0^\circ C$). Die Ribosomenkonzentration betrug 15 A_{260} Einheiten per ml. Die core-Partikel wurden durch Zentrifugation (5 Std./176 000g) sedimentiert, in core-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgAc, 1 mM EDTA, 200 mM NH_4Cl , 2 mM MÄ) resuspendiert und gegen denselben Puffer

dialysiert. Anschließend folgte eine kurze Zentrifugation zur Entfernung von Aggregaten. Die core-Partikel wurden bei -80°C gelagert.

Die split-Proteine wurden gegen core-Puffer dialysiert, lyophilisiert, anschließend in H_2O Bidest gelöst und kurz gegen Protein-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgAc, 1 mM EDTA, 400 mM NH_4Cl , 2 mM MÄ) dialysiert. Proteine wurden ebenfalls bei -80°C aufgehoben.

Gesamtproteine wurden durch Extraktion mit 66% Essigsäure in 100 mM MgAc gewonnen (Hardy et al., 1969). Die präzipitierte RNS wurde durch Zentrifugation (30 Min./30 000g) entfernt. Der proteinhaltige Überstand wurde gegen 0.1% Essigsäure dialysiert und lyophilisiert.

23S und 16S RNS wurden durch dreimaliges Phenolisieren der Untereinheiten mit Phenol-SSC-EDTA/Tris und anschließende Fällung mit dem doppelten Volumen Äthanol (-20°C) gewonnen. Die RNS wurde in TMNSH-Puffer resuspendiert.

Zur Isolierung von RNS und Proteinen aus denselben Partikeln wurde die LiCl-Harnstoff-Methode (Nomura und Erdmann, 1970) angewandt. 50S Untereinheiten wurden 48 Std. bei 0°C in 2 M LiCl/4 M Harnstoff inkubiert. Die ausgefallene RNS wurde durch Zentrifugation (20 Min./16 000g) sedimentiert. Während der

Überstand gegen 1% Essigsäure dialysiert und lyophilisiert wurde, wurde das RNS-Sediment in TMN-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 60 mM NH_4Cl) aufgenommen.

2.2.2.2.

Partielle Rekonstitution von 50S Untereinheiten

Die partielle Rekonstitution von 50S Untereinheiten aus core-Partikeln und split-Proteinen wurde nach der von Nierhaus und Montejo (1973) beschriebenen Methode durchgeführt. 5 A_{260} Einheiten core-Partikel in 25 μl core-Puffer wurden mit 6 Äquivalenz-Einheiten split-Proteinen in 75 μl Protein-Puffer gemischt und 90 Min. bei 50°C inkubiert. In einem vergrößerten Ansatz wurden 30 A_{260} Einheiten core-Partikel in 150 μl core-Puffer und 36 Äquivalenz-Einheiten Protein in 450 μl Protein-Puffer verwendet. Anschließend an die Inkubation wurden die Partikel sedimentiert (5 Std. /176 000g) und in TMNSH-Puffer aufgenommen.

2.2.3.

Herstellung von Aminoacyl-tRNS und Fragmentation

2.2.3.1.

tRNS-Beladung und Acetylierung

30 mg tRNS Gemisch oder 50 A_{260} Einheiten tRNS^{Phe} wurden in 5 ml Reaktionsvolumen mit radioaktiven Amino-

säuren beladen. Das Reaktionsgemisch enthielt 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgAc, 100 mM KCl, 3.2 mM ATP, 6 mM MÄ, 0.5 ml S150 Enzyme und zwei nMol radioaktive Aminosäure per nMol tRNS. Inkubiert wurde 15 Min. bei 37°C. Dann wurde der pH mit 20% NaAc auf pH 5.4 gesenkt und die tRNS durch Ausschütteln mit einem Volumen 75% Phenol-H₂O extrahiert. Die tRNS wurde aus der wäßrigen Phase mit dem doppelten Volumen Äthanol (-20°C) gefällt und in 2 mM KAc pH 5.9, 1 mM MgCl₂ resuspendiert. Durch eine Sephadex G50 Säule (1 cm x 50 cm), äquilibriert mit demselben Puffer, wurden Verunreinigungen mit Phenol abgetrennt.

Zur Acetylierung wurde die AA-tRNS in 250 mM NaAc pH 5.0 gelöst und im Eisbad mit Essigsäureanhydrid behandelt (8/300 Volumen, 3 x im Abstand von 15 Min. Haenni und Chapeville, 1966). Anschließend wurde lyophilisiert.

2.2.3.2.

Fragmentation von Aminoacyl-tRNS

Die tRNS-Fragmente CACCA-Leu, CACCA-Phe, CACCA-Leu-Ac und CACCA-Phe-Ac wurden nach der von Monro et al. (1969) beschriebenen Methode hergestellt. AA-tRNS wurde in 2% NaAc pH 5.4, 20 mM EDTA gelöst und bei 37°C 15 Min. mit RNase T1 behandelt (0.15 mg T1 auf 30 mg tRNS). Anschließend wurde die Probe lyophilisiert und das Fragmentgemisch, gelöst mit H₂O Bidest,

auf Whatman 3MM Papier aufgetragen. Dann wurde eine Elektrophorese (3 Std./3000 V/4°C) in Pyridin: Eisessig: H₂O = 1:10:189 pH 3.5 durchgeführt (Ghosh et al. 1967). Das beladene Fragment wanderte dabei etwa 3 cm zur Kathode. Das Fragment wurde eluiert und entweder lyophilisiert und bei -80°C eingefroren oder acetyliert, lyophilisiert und unter gleichen Bedingungen erneut einer Papierelektrophorese unterzogen. Das acetylierte Fragment wanderte jetzt zur Anode. Nach der Elution wurden die Fragmente bei -80°C gelagert.

2.2.3.3.

Isolierung von acetylierter Aminoacyl-tRNS

Die Reinigung beladener tRNS von unbeladener tRNS wurde nach Schott et al. (1973) durchgeführt. Hierbei wird eine Boratgelsäule verwendet, die die Eigenschaft hat, tRNS mit zwei freien OH-Gruppen am 3'-Ende (also alle unbeladene tRNS) zu binden. 5 mg tRNS wurden in 2 ml Puffer C (50 mM Morpholin-HCl pH 8.5, 100 mM MgCl₂, 1 mM MÄ) gelöst und auf eine Boratgelsäule, äquilibriert mit Puffer C, aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer C gewaschen, bis die Absorption des Eluats kleiner als 0.1 A₂₆₀/ml war. Anschließend wurde die an die Säule gebundene tRNS mit Puffer D (50 mM NaMES pH 5.5, 100 mM MgCl₂, 1 mM MÄ) eluiert. Die tRNS enthaltenden Fraktionen wurden lyophilisiert, über eine Sephadex G100 Säule, äquilibriert mit 2 mM KAc pH 5.9, 1 mM MgCl₂, ent-

salzt und erneut lyophilisiert. Nach Beladung und Acetylierung wurde das tRNS Gemisch zum zweitenmal auf die Boratgelsäule gegeben. Die jetzt mit Puffer C eluierte beladene tRNS wurde lyophilisiert, über eine Sephadex G50 Säule entsalzt und noch einmal durch Lyophilisieren konzentriert. Gelagert wurde sie bei -80°C . Die Boratgelsäule wurde mit Puffer D von unbeladener tRNS befreit.

2.2.4.

In vitro Proteinsynthese-Systeme

2.2.4.1.

Das S30 System

50 μl S30-Extrakt in KPO_4 -Puffer wurden mit 100 μl Puffer zu folgenden Salzkonzentrationen verdünnt: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 7 mM MgAc, 100 mM NH_4Cl , 6 mM MÄ. Außerdem enthielt das Inkubationsgemisch 20 mM PEP, 2 mM ATP, 0.5 mM GTP und 0.4 mM je-der Aminosäure, außer der radioaktiven, deren Einbau gemessen werden sollte. Zur Aktivitätsmessung wurde mit radioaktiver Aminosäure beladene tRNS zugegeben (100 000 cpm/Probe). Nach Inkubation (15 Min./ 37°C) wurde das synthetisierte Material mit 5% TCA bei 90°C gefällt, die Probe abgekühlt und durch einen Glasfilter filtriert. Nachgewaschen wurde mit 2 x 2 ml 5% TCA. Der Filter wurde durch Waschen mit 5 ml einer Äther-Äthanol Mischung (1:1) getrocknet und mit 5 ml Instagel gezählt.

2.2.4.2.

R17-RNS abhängige Proteinsynthese

Die in vitro Proteinsynthese mit natürlicher m-RNS (R17) wurde modifiziert nach Funatsu et al. (1972) durchgeführt. 1 A₂₆₀ Einheit 70S wurde in 25 µl eines Präinkubationsgemisches (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM NH₄Cl, 10 mM MgAc, 1 mM DTT, 0.1 mM je Aminosäure, Valin 0.075 mM) mit 15 µl TMNSH-Puffer, 35 µl S150 und 1 A₂₆₀ Einheit tRNS vorinkubiert (30 Min./37°C). Anschließend wurden (¹⁴C)-Valin, Pyruvatkinase, Initiationsfaktoren und R17-RNS zugegeben. 225 µl Inkubationsgemisch enthielten 1 A₂₆₀ Einheit R17-RNS, 0.1 mM je Aminosäure, 0.025 mM Valin, 4 µM (¹⁴C)-Valin, 60 mM Tris-HCl pH 7.5, 8 mM MgAc, 54 mM NH₄Cl, 2.25 mM DTT, 0.2 mM GTP, 0.16 mM ATP, 6 mM PEP und 5 mM Polyäthylenglycol 6000. Nach 30 Min. bei 37°C wurde je Probe ein Tropfen einer 1% Albuminlösung und 2 ml 5% TCA hinzugegeben. Die weitere Behandlung der Proben geschah wie unter 2.2.4.1. beschrieben.

2.2.4.3.

Poly(U) abhängige Poly(Phe)-Synthese und Poly(C) abhängige Poly(Pro)-Synthese

Das Inkubationsgemisch (150 µl) enthielt 12 mM Tris-HCl pH 7.8, 50 mM NH₄Cl, 20 mM KOH (zum Neutralisieren von Nukleotiden und Aminosäuren), 1.3 mM ATP, 0.4 mM GTP, 0.45 mM PEP, 3 µg Pyruvatkinase, 3 mM MÄ,

12 μ l S150, 40 μ g tRNS, 1 A₂₆₀ Einheit 70S und entweder 0.001 mM (¹⁴C)-Phenylalanin und 40 μ g Poly(U) oder 0.001 mM (³H)-Prolin und 40 μ g Poly(C). Inkubiert wurde 45 Min. bei 30°C (Traub und Nomura, 1968; modifiziert von Nierhaus et al., 1973). Die Radioaktivität des polymerisierten Materials wurde wie bei 2.2.4.1. bestimmt.

2.2.4.4.

Poly(A) abhängige Poly(Lys)-Synthese

Das Inkubationsgemisch (150 μ l) enthielt die gleichen Salzkonzentrationen und Enzyme wie die unter 2.2.4.3. beschriebenen Systeme. Es wurde eine Präinkubation mit 0.33 mM je Aminosäure mit Ausnahme von Lysin (6.67 μ M) durchgeführt, um endogene m-RNS zu verbrauchen (30 Min./37°C). Dann wurden 12 μ g Poly(A) und 0.002 mM (³H)-Lysin zugegeben und die Hauptinkubation (60 Min./37°C) angeschlossen. Nach der Inkubation wurde Peptidyl-tRNS durch Zugabe von 50 μ l 2 N NaOH hydrolysiert (15 Min./37°C) und anschließend das Inkubationsgemisch mit 50 μ l 2 N Essigsäure neutralisiert. Die Peptide wurden mit 5 ml 0.25% Wolfram-5% TCA bei 0°C gefällt, durch Zellulosenitrat-Filter filtriert und mit Wolfram-TCA gewaschen (Gardner et al., 1962). Die Filter wurden unter einer Infrarotlampe getrocknet und die Radioaktivität des Präzipitats wurde gemessen.

2.2.4.5.

Nichtenzymatische Translation (NET)

Die nichtenzymatische Poly(U) abhängige Poly(Phe)-Synthese wurde nach Pestka (1969) getestet. In einem Reaktionsvolumen von 60 μ l wurden mit 0.5 M LiCl gewaschene 70S Ribosomen ($0.5 A_{260}$) mit 20 μ g Poly(U) und 2 A_{260} Einheiten (3H)-Phe-tRNS bei Salzkonzentrationen von 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 120 mM NH_4Cl , 13 mM MgAc und 0.1 mM p-Hydroxymercuribenzoessäure (Gavrilowa und Spirin, 1971) 5 Std. lang bei 35°C inkubiert. Die Aktivität wurde wie oben (2.2.4.2.) beschrieben gemessen.

2.2.5.

Bindungstests für tRNS, Fragmente und Antibiotika

2.2.5.1.

Fällungstest für tRNS-Fragmente

Zwei pMol (25 000 cpm) CACCA-Leu oder CACCA-Phe wurden in einem Reaktionsvolumen von 90 μ l (30 mM Tris-HCl pH 7.2, 25 mM MgAc, 20 mM NH_4Cl , 200 mM KCl, 50% Äthanol; Dietrich et al., 1974) mit 8 A_{260} Einheiten 50S Untereinheiten 15 Min. im Eisbad inkubiert. Dann wurden die Ribosomen mit dem gebundenen Fragment durch Zentrifugation sedimentiert (Celma et al., 1970) und die Radioaktivität in 60 μ l des Überstandes gemessen. Der Vergleich mit einer Probe ohne 50S ergab die ge-

bundene Fragmentmenge. Die Bindung von acetylierten Fragmenten wurde analog mit 3 A₂₆₀ 50S Untereinheiten durchgeführt. Der Bindungspuffer enthielt 30 mM Tris-HCl pH 7.2, 17 mM MgAc, 22 mM NH₄Cl, 150 mM KCl und 50% Äthanol.

2.2.5.2.

Fragment-Bindung in der Gleichgewichtsdialyse

Die Gleichgewichtsdialyse wurde in Plastik-Dialysezellen (2 x 2 x 2 cm) ausgeführt. Die Zellen enthalten zwei 50 µl - Kammern, die durch eine Membran voneinander getrennt werden. Als Dialysemembran diente ein Zelluloseacetat-Filter (AC 64) von Schleicher und Schüll. In die linke Kammer wurden 3 A₂₆₀ Einheiten (100 pMol) hitzeaktivierte (25 Min./37°C) 50S Untereinheiten in 30 µl Bindungspuffer (siehe 2.2.5.1.) gegeben, in die rechte Kammer 0.5 - 20 pMol Fragment in 30 µl Bindungspuffer. Die Zellen wurden luftdicht verschlossen und 22 Std. bei 4°C inkubiert. Nach Einstellung des Gleichgewichts wurden aus jeder Kammer 2 x 10 µl entnommen. Zu diesen Proben wurden 0.2 ml Soluene 350 und 5 ml Toluol-PPO-POPOP zugegeben und die Radioaktivität bestimmt. Die Differenz zwischen beiden Kammern ergab die gebundene Fragmentmenge. Es wurden jeweils Doppel- oder Dreifachbestimmungen ausgeführt. Zum Füllen und Leeren der Kammern wurden Mikrospritzen (Terumo) verwendet.

2.2.5.3.

Ac-(³H)-Leu-tRNS Bindung an Ribosomen und Unter-
einheiten

1.5 pMol (20 000 cpm) Ac-(³H)-Leu-tRNS wurden in einem Reaktionsvolumen von 150 µl (33 mM Tris-HCL pH 7.5, 13 mM MgAc, 250 mM KCl, 120 mM NH₄Cl, 0.3 mM EDTA, 0.7 mM MÄ, 33% Äthanol) mit 4 A₂₆₀ Einheiten 50S, 30S oder 70S 20 Min. bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde das Inkubationsgemisch durch einen Zello-senitrat-Filter filtriert und mit 10 ml Inkubati-onspuffer gewaschen. Die Filter wurden unter Rot-licht getrocknet und mit 5 ml Instagel gezählt. Leu-tRNS wurde unter identischen Bedingungen gebun-den.

2.2.5.4.

IF-abhängige Ac-Phe-tRNS Bindung

Die IF-abhängige tRNS Bindung wurde verändert nach Zagorska et al., (1971) durchgeführt. Das Reaktionsge-misch enthielt in 100 µl: 5 µg Poly(U), 1.5 A₂₆₀ Ein-heiten Ac-(¹⁴C)-Phe-tRNS, 2 A₂₆₀ 50S, 1 A₂₆₀ Einheit 30S. Außerdem wurden 10 µl einer ribosomalen Wasch-fraktion (1 M NH₄Cl) als Initiationsfaktoren zugege-ben. Bei einer Endkonzentration von 10 mM Tris-HCl pH 7.2, 4 mM MgAc, 80 mM NH₄Cl, 12 mM MÄ und 0.1 mM GTP wurde das Gemisch 20 Min. bei 30°C inkubiert. Die Ribosomen wurden auf einem Zellulosenitrat-Filter ge-

sammelt, mit 9 ml Bindungspuffer gewaschen und anschließend getrocknet. Die Ribosomen wurden in 5 ml Instagel gelöst und die Radioaktivität gemessen.

2.2.5.5.

EF-T-abhängige Phe-tRNS Bindung

Verändert nach Ballesta (1974) wurden in einem Reaktionsansatz von 100 μ l 5 μ g Poly(U), 1 A₂₆₀ Einheit (¹⁴C)-Phe-tRNS, 1 A₂₆₀ Einheit 30S, 2 A₂₆₀ 50S und 5 μ l EF-T mit Puffer gemischt, so daß die Endkonzentrationen 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 100 mM NH₄Cl und 1 mM DTT betrugen. Es wurden 5 μ l 0.03 mM GTP zugegeben und die Proben 5 Min. bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden abgekühlt und wie oben (2.2.5.4.) weiterbehandelt.

2.2.5.6.

(³H)-GTP Bindung an EF-T

(³H)-GTP wurde in 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgAc, 150 mM NH₄Cl und 1 mM MÄ mit 2 μ l EF-T inkubiert. Das Reaktionsgemisch (40 μ l) wurde zuerst 5 Min. bei 30°C erwärmt und anschließend 20 Min. bei 0°C gehalten. Dann wurde mit 2 ml Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgAc) verdünnt. Die Probe wurde durch einen Zellulosenitrat-Filter filtriert, der mit 2 x 2 ml Verdünnungspuffer nachgewaschen wurde. Nach dem Trocknen wurde die Radioaktivität gemessen, In einigen

Versuchen wurde die (^3H)-GTP Bindung in Gegenwart von Phe-tRNS durchgeführt, um die Bildung des ternären Komplexes zu untersuchen.

2.2.5.7.

Antibiotika Bindung an 50S Untereinheiten

(^{14}C)-Chloramphenicol wurde mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse nach der von Nierhaus und Nierhaus (1973) veröffentlichten Methode an 50S Untereinheiten gebunden. Der Bindungspuffer enthielt 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 280 mM NH_4Cl und 5 mM MÄ. In einer Kammer der Zelle, die durch eine Dialysemembran (Visking, Serva) geteilt wurde, befanden sich 8 A_{260} 50S in 30 μl Puffer, in der anderen Seite 0.2 nMol (^{14}C)-Chloramphenicol in ebenfalls 30 μl Puffer. Die Zellen wurden 20 Std. bei 4°C inkubiert und anschließend wurden aus jeder Kammer 2 x 10 μl zur Bestimmung der gebundenen Radioaktivität entnommen.

Auch die Bindung von (^3H)-Puromycindihydrochlorid an 50S Untereinheiten wurde in der Gleichgewichtsdialyse durchgeführt (Nierhaus und Nierhaus, unveröffentlichte Ergebnisse). Jede der beiden Kammern enthielt 40 μl Puffer mit folgenden Salzkonzentrationen: 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 45 mM MgCl_2 , 530 mM NH_4Cl , 5 mM MÄ, 18% Äthanol. 4 pMol (^3H)-Puromycin wurden in die eine und 8 A_{260} Einheiten 50S in die andere Kammer gegeben. Die verschlossenen Zellen wurden 20 Std. bei 4°C inkubiert. Dann wurden aus jeder Kammer 2 x 15 μl

entnommen, und die Radioaktivität in beiden Kammern wurde bestimmt. Für die Gleichgewichtsdialysen wurden ausschließlich hitzeaktivierte 50S Untereinheiten (25 Min./37°C) verwendet.

2.2.6.

Peptidyltransferase-Tests

2.2.6.1.

tRNS-Peptidyltransferase-Test

In 1.8 ml eines Reaktionsgemisches (33 mM Tris-HCl pH 7.8, 13 mM MgAc, 250 mM KCl, 117 mM NH_4Cl , 0.3 mM EDTA, 0.7 mM MÄ, 33% Äthanol), das 25 A_{260} Einheiten 50S enthielt, wurden 50 pMol $\text{Ac-(}^3\text{H)-Leu-tRNS}^{\text{Leu}}$ oder $\text{Ac-(}^3\text{H)-Phe-tRNS}^{\text{Phe}}$ und 2 nMol $(^3\text{H)-AA-tRNS}$ (Gemisch, in dem alle tRNS Spezies beladen waren) 2 Std. bei 0°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μl 1 N KOH unterbrochen. Die Mischung wurde bei pH 9.0 für 30 Min. auf 45°C erwärmt, um die Esterbindung zwischen tRNS und Peptiden zu spalten. Dann wurden die Untereinheiten durch Zentrifugation (10 Min./20 000g) entfernt. Der Überstand wurde am Rotavapor eingeeengt, mit 1/3 40% Sucrose gemischt und auf eine Biogel-P2 Säule (1.5 cm x 150 cm), äquilibriert mit 5 mM Tris-HCl pH 7.5, aufgetragen. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde bestimmt, und eluierte Peptide wurden gesammelt.

2.2.6.2.

tRNS-Puromycin-Test

In 150 μ l des oben (2.2.6.1.) beschriebenen Reaktionsgemisches wurden 2 A₂₆₀ 50S Untereinheiten mit 0.8 pMol Ac-(³H)-Leu-tRNS oder mit bis zu 17 pMol Ac-(³H)-Leu-tRNS^{Leu} und 200 nMol Puromycin 45 Min. bei 0°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l 0.3 M NaAc pH 5.5 (MgSO₄ gesättigt) beendet, und das gebildete Ac-(³H)-Leu-Puromycin mit 1.5 ml Essigsäureäthylester ausgeschüttelt. 1 ml der organischen Phase wurde abgenommen und mit 5 ml Instagel im Scintillationszähler gemessen.

2.2.6.3.

Fragment-Test

Die Peptidyltransferaseaktivität wurde auch im Fragment-Test (Monro, 1971) modifiziert von Nierhaus und Montejo (1973) untersucht. Im gleichen Reaktionsgemisch (150 μ l) wie oben (2.2.6.1.) wurden 2.5 A₂₆₀ Einheiten 50S mit 3 pMol CACCA-(³H)-Leu-Ac und 200 nMol Puromycin 45 Min. im Eisbad inkubiert. Die Proben wurden weiterbehandelt, wie unter 2.2.6.2. beschrieben.

2.2.7.

Affinitätsmarkierung der P-Region

2.2.7.1.

Affinitätsmarkierung von 50S Untereinheiten mit CACCA-(^{14}C)-Leu-Ac-Br

In 5.8 ml des oben beschriebenen Reaktionsgemisches ohne Mercaptoäthanol wurden 100 A_{260} Einheiten 50S mit 1800 pMol CACCA-(^{14}C)-Leu-Ac-Br und 270 nMol (^3H)-Puromycindihydrochlorid 5 Std. im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Äthanol zugegeben, und die Untereinheiten abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 2 ml Inkubationspuffer mit 66% Äthanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die 50S Untereinheiten in TMN-Puffer aufgenommen. Ribosomenkonzentration per ml und Radioaktivität wurden bestimmt und die Partikel bei -80°C aufgehoben. Proteine und RNS der Partikel wurden durch die LiCl-Harnstoff-Methode (2.2.2.1.) voneinander getrennt.

2.2.7.2.

Analyse der markierten Proteine mit zwei-dimensionaler Acrylamidgel-Elektrophorese

Die 2D-Elektrophorese (Kaltschmidt und Wittmann, 1970) wurde modifiziert ausgeführt. Die Plattengröße war auf ein Viertel verkleinert, damit auch kleine Proteinmengen untersucht werden konnten. Das Probengel enthielt kein $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ und der pH von Gel und Puffer in der 1. Dimension betrug 7.65. Die Elektrophorese in der 1. Dimension in 10% Acrylamid dauerte 26 Std. Die 2. Dimension war unverändert (Dauer 22 Std.,

18% Acrylamid). Die Platten wurden 5 Min. in einer Amidoschwarz-Lösung gefärbt und über Nacht unter fließendem Wasser entfärbt. Die Proteinflecken wurden ausgeschnitten, zerkleinert und mit 5 ml Instagel gelöst. Die Radioaktivität wurde gemessen.

2.2.8.

Analyse von Peptiden

2.2.8.1.

BD-Zellulose-Säulen

Nach der von Pestka et al. (1969) beschriebenen Methode wurde versucht, Mono-, Di- und Oligophenylalanin durch Adsorption an BD-Zellulose zu trennen. Die Zellulose wurde in 50 mM KAc pH 5.7 äquilibriert und in Säulen gefüllt (0.5 x 2 cm). Proben, die Ac-(³H)-Phe, Ac-(³H)-Phe-Phe und eventuell längere Peptide enthielten, wurden in 1 ml 50 mM KAc pH 5.7 gelöst auf die Säule aufgetragen. Mit weiteren 2 ml KAc wurde gewaschen, um Phenylalanin zu eluieren. Anschließend wurde mit 3 ml von Lösung 2 (Formamid: Äthanol:H₂O = 32:30:38) und mit 3 ml von Lösung 3 (Formamid:Äthanol:H₂O = 65:30:5) gewaschen. Die Fraktionsgröße betrug 0.3 ml. 0.2 ml davon wurden zur Radioaktivitätsmessung mit 5 ml Instagel gemischt.

2.2.8.2.

Biogel-P2 Säule

Biogel-P2 (200-400 mesh) wurde mit 5 mM Tris-HCl pH 7.5 äquiliibriert. Die Säulenmaße betrugen 1.5 x 150 cm. Die Probe wurde mit 1/3 40% Sucrose und Phenolrot zur Markierung vermischt und in einem Volumen von 0.3 ml aufgetragen. Es wurden Fraktionen von 1.8 ml Volumen genommen, von denen 0.2 ml zur Radioaktivitätsbestimmung verwendet wurden. Radioaktivität enthaltende Fraktionen wurden am Rotavapor eingeengt.

2.2.8.3.

Analyse der Aminosäuren von Oligopeptiden

Peptide (Ac-(^3H)-Leu-(^3H)-X) wurden mit 5.7 N HCl hydrolysiert (20 Std./110°C). Dazu wurden etwa 2 nMol Dipeptid in 0.2 ml 5.7 N HCl gelöst und in ein Glasröhrchen eingeschmolzen. Nach der Hydrolyse wurde die Flüssigkeit verdampft und die Spaltprodukte auf Dünnschichtplatten (CEL 300) aufgetragen.

Die radioaktiven Aminosäuren und die Ausgangs-Peptide wurden durch die Dünnschicht-Elektrophorese und Chromatografie zwei-dimensional aufgetrennt (Stadler und Wittmann-Liebold, 1976). Um die Auffindung der nicht färbbaren N-blockierten Substanzen zu erleichtern, wurde die CEL 300 Platte in 400 Felder eingeteilt. Die Probe wurde 2 cm vom unteren Rand 1 cm rechts von der

Mitte aufgetragen. Kalte Aminosäuren wurden als Marker zugefügt. Die mit Elektrophorese-Puffer (Pyridin: Eisessig:H₂O:Aceton = 40:80:1580:300) befeuchtete Platte wurde in einer mit Leitungswasser gekühlten Kammer 110 Min. bei 400 V in der 1. Dimension entwickelt. Nach dem Trocknen der Platte schloß sich eine aufsteigende Chromatografie an. Der Chromatografie-Puffer enthielt 50 ml Pyridin, 75 ml n-Butanol-1, 15 ml Eisessig und 60 ml H₂O. Danach wurde die Platte erneut getrocknet, mit Ninhydrinlösung besprüht und zum Entwickeln kurz erwärmt. Die Radioaktivität in den Aminosäureflecken oder den einzelnen Feldern wurde gemessen.

3.

Ergebnisse

3.1.

Entwicklung und Charakterisierung der Methoden

3.1.1.

Bindung beladener tRNS an 70S und Untereinheiten

Es wurde eine Methode entwickelt, um die Bindung von Ac-(^3H)-Leu-tRNS und (^3H)-Leu-tRNS (bzw. (^3H)-Phe-tRNS^{Phe}) an Ribosomen und Untereinheiten ohne m-RNS mittels Filtrieren des Inkubationsgemisches durch Zellulosenitrat-Filter nachzuweisen. Dazu wurde das Inkubationsgemisch entweder vor dem Filtrieren mit 1 ml eiskaltem Inkubationspuffer verdünnt und anschließend auf den angefeuchteten Filter gegeben, oder (bei Untersuchung von Antibiotika-Wirkung) unverdünnt filtriert.

Abb. 1 zeigt die unterschiedlichen Bindungsaktivitäten der untersuchten Partikel. Es wurde hauptsächlich Bindung an 70S Ribosomen und 50S Untereinheiten gefunden, während beim Einsatz äquimolarer Partikelmen-gen die Bindung an 30S Untereinheiten sehr gering war. Sie betrug nur $1/4$ bis $1/10$ der Bindung, die für 50S Untereinheiten gemessen wurde.

Bei Verwendung von gereinigter Ac-(^3H)-Leu-tRNS^{Leu}

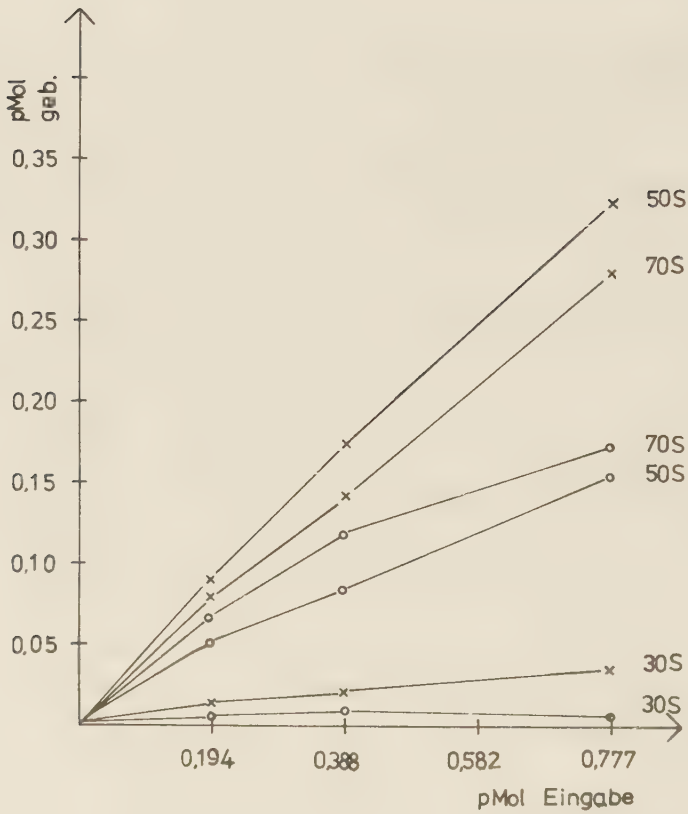


Abb. 1

Bindung von steigenden Mengen Ac-(³H)-Leu-tRNS (o—o) und (³H)-Leu-tRNS (x—x) an je 144 pMol 70S, 50S und 30S.

im Bindungstest ergab sich eine höhere Bindung an beide Untereinheiten. Für die Bindung an 30S Untereinheiten wurde eine Steigerung um etwa 100% beobachtet, während die 50S-Bindung um 50% verbessert wurde.

Tabelle 1

Ac-(³H)-Leu-tRNS und Ac-(³H)-Leu-tRNS^{Leu} Bindung an 30S und 50S Untereinheiten

1 pMol tRNS	30S (260 pMol)	50S (144 pMol)
Ac-(³ H)-Leu-tRNS	0.055 pMol	0.091 pMol
Ac-(³ H)-Leu-tRNS ^{Leu}	0.108 pMol	0.130 pMol

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die im tRNS Gemisch vorhandene unbeladene tRNS eine Konkurrenz zur aminoacylierten tRNS darstellt. Es konnte durch Bindungsversuche mit steigender Menge unbeladener tRNS bei gleichbleibender Menge beladener tRNS gezeigt werden, daß eine Hemmung sowohl der AA-tRNS als auch der Ac-AA-tRNS Bindung eintritt (Abb. 2 und Abb. 3). Besonders stark gehemmt wird die Bindung der beladenen tRNS an 30S Untereinheiten. Hier wurde die Ac-Leu-tRNS^{Leu} Bindung durch einen 25fachen Überschuß von tRNS auf wenige Prozent (6) reduziert, während die Phe-tRNS^{Phe} Bindung noch bei 37% lag. Die Phe-tRNS^{Phe} läßt sich auch mit einem größeren Über-

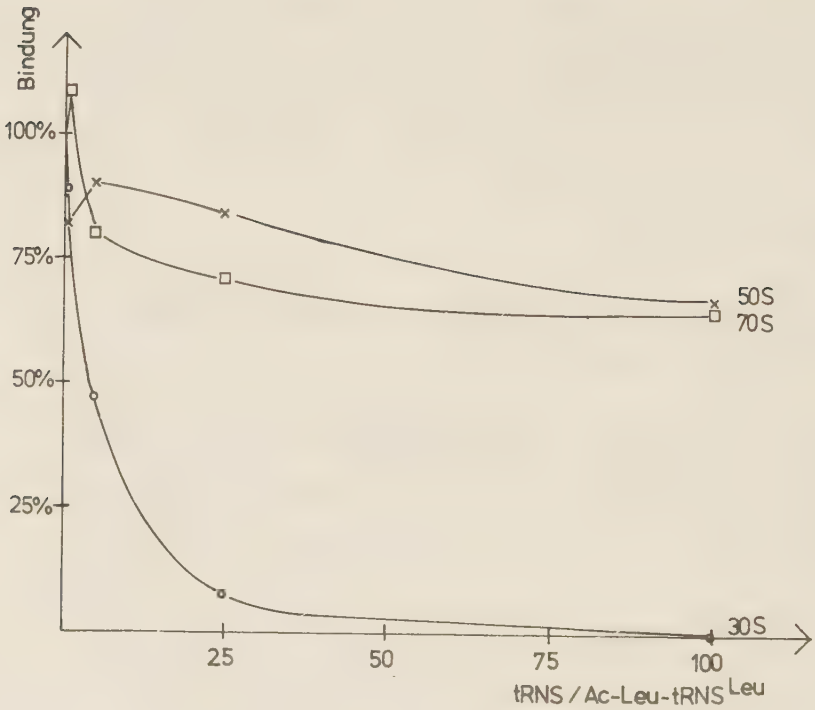


Abb. 2

Bindung von $\text{Ac-}(^3\text{H})\text{-Leu-tRNS}^{\text{Leu}}$ (0.51 pMol/Probe) an je 4 A_{260} 70S (96 pMol), 50S (144 pMol) und 30S (256 pMol) bei Zugabe von steigenden Mengen von unbeladener tRNS. 100% Bindung sind bei 70S 4061 cpm , bei 50S 2251 cpm und bei 30S 636 cpm .

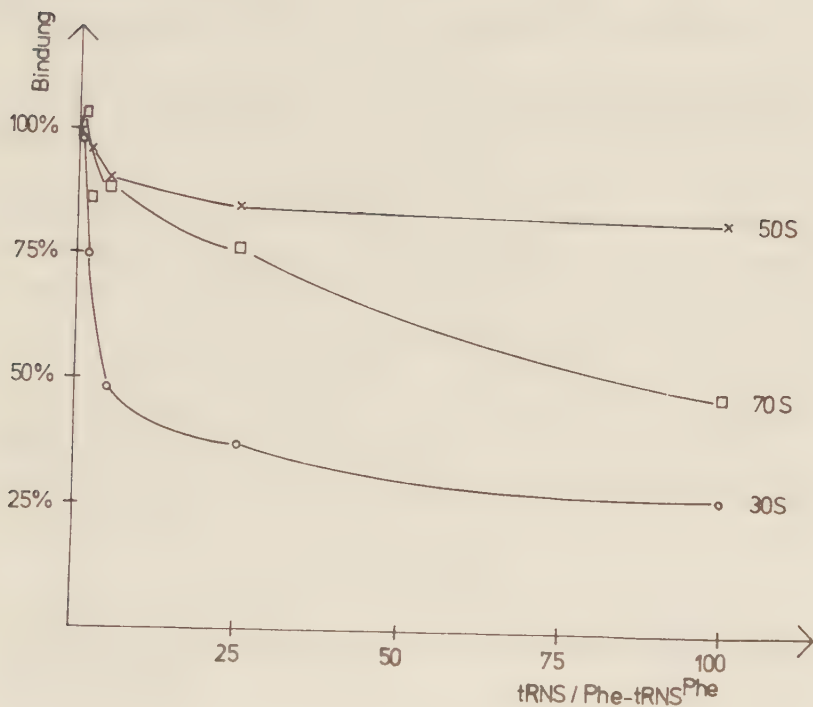


Abb. 3

Bindung von (^3H)-Phe-tRNA^{Phe} (2 pMol/Probe) an je
4 A₂₆₀ 70S, 50S und 30S bei Zugabe von steigenden
Mengen unbeladener tRNA. 100% Bindung sind bei 70S
4310 cpm, bei 50S 4268 cpm und bei 30S 2025 cpm.

schoß an tRNS nicht vollständig aus der 30S Untereinheit verdrängen.

Die Bindung der beladenen tRNS an 70S und 50S scheint stabiler zu sein als bei 30S Untereinheiten. Eine Verdrängung tritt erst bei höheren tRNS-Konzentrationen auf. Dabei ist deutlich zu sehen, daß die Verdrängungskurven für Ac-Leu-tRNS^{Leu} bei 70S und 50S gleich verlaufen, während bei der Verdrängungskurve für Phe-tRNS^{Phe} die 70S Ribosomen zwischen 50S und 30S liegen. Von 50S Untereinheiten läßt sich die acetylierte Leu-tRNS etwas leichter verdrängen als die Phe-tRNS, die erst bei einem Verhältnis von 1:750 Phe-tRNS^{Phe} : tRNS zu 50% in ihrer Bindung inhibiert wird. Diese starke Bindung ist nicht spezifisch für Phe-tRNS, da dasselbe Ergebnis auch mit Leu-tRNS erzielt wurde. Es ist daher bei 50S und 70S ein großer Überschuß an unbeladener tRNS notwendig, um eine Verdrängung von beladener tRNS hervorzurufen.

Alle Bindungstests wurden mit geringen AA-tRNS bzw. Ac-AA-tRNS Mengen durchgeführt, da bei Radioaktivitätsmengen über 50 000 cpm die Bindung an den Filter stark anstieg und in ein ungünstiges Verhältnis zu an Ribosomen gebundenem Material geriet. Mehr als 6 A₂₆₀ Einheiten Ribosomen konnten nicht mehr filtriert werden.

3.1.1.1.

tRNS Bindung an 50S LiCl-core-Partikel

Durch stufenweises Abwaschen von Proteinen bei LiCl-Behandlung von 50S Untereinheiten läßt sich die Bindung der AA-tRNS bzw. Ac-AA-tRNS vermindern (Abb. 4). Der stärkste Aktivitätsverlust wurde beim Übergang vom 0.4 core-Partikel zum 0.6 core oder 0.8 core beobachtet. Während dann keine weitere Verminderung des Bindungsvermögens für Ac-Leu-tRNS auftritt, und sogar das hochmolekulare 4.0 core-Partikel und phenolbehandelte 23S RNS noch 50% der bei 50S Untereinheiten gefundenen Aktivität aufweisen, sinkt die Leu-tRNS Bindung bei reiner 23S RNS auf 16% ab. eine totale Hemmung konnte nicht beobachtet werden.

3.1.1.2.

Einfluß von verschiedenen Proteinsynthese-Hemmern (Antibiotika)

Die Wirkung verschiedener Antibiotika auf Ac-AA-tRNS und AA-tRNS Bindung an 30S und 50S Untereinheiten kann benutzt werden, um möglicherweise unterschiedliche Bindungsstellen für die tRNS-Sorten (Peptidyl- bzw. Aminoacyl-tRNS) festzustellen. Um deutliche Bindung auch an die kleine Untereinheit beobachten zu können, wurde eine 30S-Konzentration von 260 pMol ($4 A_{260}$ Einheiten) per Ansatz gewählt. Für die Bindung an 50S wurden 144 pMol ($4 A_{260}$) eingesetzt.

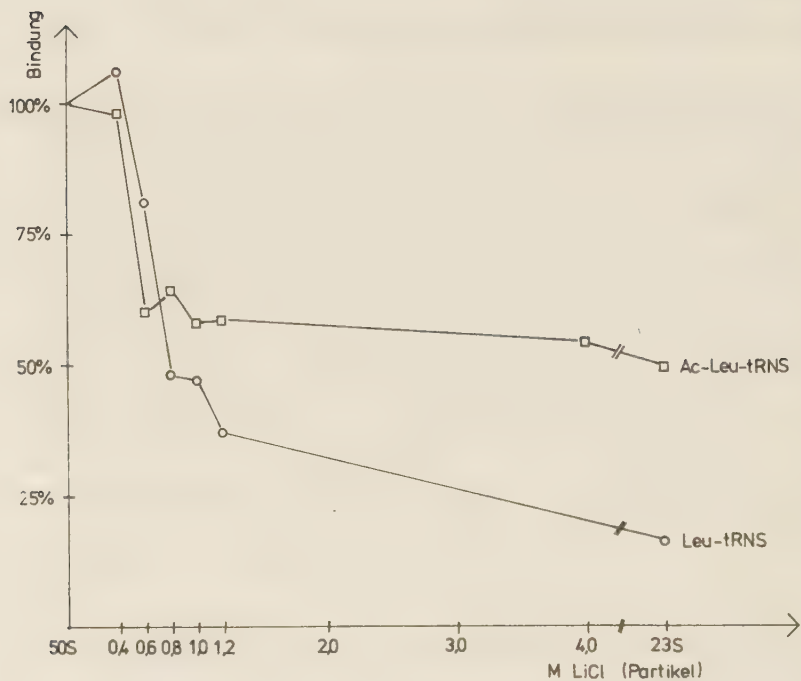


Abb. 4

Bindung von Ac-(^3H)-Leu-tRNS (100% = 2984 cpm) und (^3H)-Leu-tRNS (100% = 2540 cpm) an 50S Untereinheiten, core-Partikel mit abnehmendem Proteingehalt und 23S RNS.

Es wurden mehrere für 30S bzw. 50S spezifische Antibiotika untersucht. Keines der 30S-Antibiotika hatte einen Einfluß auf die tRNS Bindung an 50S und umgekehrt galt dasselbe. Tabelle 2 zeigt die Wirkung der untersuchten Antibiotika auf die Bindung von (^3H)-Leu-tRNS und Ac-(^3H)-Leu-tRNS an 30S und 50S Untereinheiten.

Zwei Antibiotika, nämlich Streptomycin und Neomycin hatten eine stimulierende Wirkung auf die Ac-Leu-tRNS Bindung an 30S. Dabei hemmte Streptomycin gleichzeitig die Leu-tRNS Bindung, die von Neomycin nicht beeinflusst wurde. Spectinomycin verminderte die Ac-Leu-tRNS Bindung um etwa 20%, hatte jedoch nur eine geringe Wirkung auf die Leu-tRNS Bindung. Kanamycin und Tetracyclin waren in beiden Fällen nicht in der Lage, eine Verminderung der Bindung hervorzurufen. Dagegen wurde die Bindung beider tRNS-Moleküle durch Kasugamycin und Chlortetracyclin gehemmt, wobei Kasugamycin mehr die acetylierte Leu-tRNS und Chlortetracyclin mehr die Leu-tRNS beeinflusst.

Bei der Untersuchung der 50S Untereinheiten wurden zwei Antibiotika gefunden, die eine Stimulierung der Ac-Leu-tRNS Bindung bewirkten, ohne die Leu-tRNS in gleicher Weise zu beeinflussen: Chloramphenicol und Erythromycin. (Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei der tRNS-Fragment Bindung beobachtet werden.) Lincomycin und Tetracyclin übten eine stärkere

Tabelle 2

Antibiotika-Wirkung auf Ac-Leu-tRNS und Leu-tRNS Bindung an 30S und 50S Untereinheiten

30S	100%	SM	SpC	Kana	Kasu	Neo	TC	CTC
Ac-(³ H)-Leu-tRNS	2426 cpm	140	83	96	34	135	95	77
(³ H)-Leu-tRNS	1706 cpm	63	89	99	58	96	104	51
50S	100%	CAM	Ery	PM	Linc	TC	CTC	
Ac-(³ H)-Leu-tRNS	4722 cpm	107	110	34	71	80	68	
(³ H)-Leu-tRNS	3475 cpm	85	87	86	87	97	67	

Streptomycin (SM), Spectinomycin (SpC), Kanamycin (Kana), Kasugamycin (Kasu), Neomycin (Neo), Tetracyclin (TC), und Chlorotetracyclin (CTC) hatten eine Konzentration von 4 mM, Chloramphenicol (CAM), Erythromycin (Ery) und Lincomycin (Linc) eine Konzentration von 2 mM und Puromycin (PM) von 1.3 mM. Die Bindungswerte sind in Prozent angegeben.

Hemmwirkung auf die Ac-Leu-tRNS Bindung als auf die Leu-tRNS Bindung aus, während Chlortetracyclin beide tRNS-Moleküle gleich stark inhibiert. Die beobachtete Hemmung der Ac-Leu-tRNS Bindung durch Puromycin ist auf die ständig stattfindende Peptidyltransferase-Reaktion zurückzuführen, die Ac-(^3H)-Leu-Puromycin aus dem Ribosom entfernt.

3.1.2.

tRNS-Peptidyltransferase-Test

Es wurde vermutet, daß isolierte 50S Untereinheiten in einem geeigneten System nicht nur eine Peptidbindung sondern auch eine Art Elongation der begonnenen Peptidkette durchführen können (Monro, 1969). Dazu ist eine Translokation nötig, die die Peptidyl-tRNS von der A-Region in die P-Region verschiebt. Um nachzuprüfen, ob längerkettige (Tri- und Tetra-) Peptide entstehen, und um ihre Zusammensetzung zu untersuchen, wurde ein Peptidyltransferase-Test verwendet, in dem Ac-(^3H)-Leu-tRNS die Donorfunktion und (^3H)-AA-tRNS die Akzeptorfunktion erfüllten.

50S Untereinheiten wurden in Puffer (33% Äthanol) mit einer gereinigten acetylierten AA-tRNS (Ac-Leu-tRNS oder Ac-Phe-tRNS) und einem Gemisch von beladener (^3H)-AA-tRNS inkubiert. Die gebildeten Peptide wurden säulenchromatografisch aufgetrennt und analysiert.

Der Versuch, ausschließlich mit einer gereinigten tRNS, nämlich tRNS^{Phe}, zu arbeiten, und die Peptide (Ac-(¹⁴C)-Phe-(³H)-Phe) auf BD-Zellulose Säulen nach Pestka (1969) zu bestimmen, schlug fehl, da Ac-(¹⁴C)-Phenylalanin nicht wie Phenylalanin im ersten Waschvorgang eluiert werden konnte. Alle Fraktionen, die Peptide enthalten sollten, waren mit Ac-(¹⁴C)-Phe verunreinigt. Eine quantitative Bestimmung gebildeter Peptide konnte daher nicht in dieser Weise vorgenommen werden.

Dagegen war es möglich, die hydrophoben Peptide von Ac-(¹⁴C)-Phenylalanin durch Dünnschicht-Elektrophorese in der ersten und aufsteigende Chromatografie in der zweiten Dimension zu trennen. Ac-(¹⁴C)-Phenylalanin wanderte in der ersten Dimension zur positiven Elektrode, während sich das Peptid kaum bewegte. In der zweiten Dimension wanderten beide Substanzen in der Front des Chromatografie-Puffers. Während des Chromatografie-Schrittes trennte sich Phenylalanin von dem Peptid (Abb. 5).

Mit dieser Methode konnten auch Peptide aus Ac-(³H)-Leucin und (³H)-Leucin oder (³H)-Phenylalanin untersucht werden. Ac-Leucin wanderte identisch mit Ac-Phenylalanin, während Leucin und Phenylalanin sich überschnitten. Die Peptide befanden sich auf der Dünnschichtplatte oberhalb der nicht-acetylierten Aminosäuren. Als Aminosäureakzeptoren wurden die tRNS-Fragmente CACCA-(³H)-Leu oder CACCA-(³H)-Phe angeboten. Diese

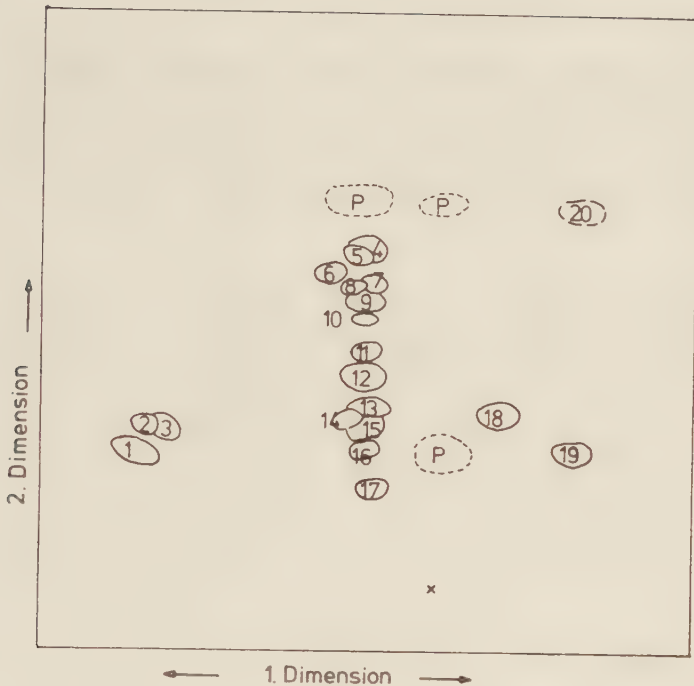


Abb. 5

Dünnschicht-Elektrophorese und Chromatografie von Aminosäuren und Peptiden ($\text{Ac-(}^3\text{H)-Leu-(}^3\text{H)-X}$). 1=Lys, 2=His, 3=Arg, 4=Leu/Ile, 5=Phe, 6=Trp, 7=Met, 8=Thr, 9=Val, 10=Cys, 11=Pro, 12=Ala, 13=Ser, 14=Gly, 15=Gln, 16=Asn, 17=Tyr, 18=Glu, 19=Asp, 20=Ac-Leu, P=Peptide, x=Auftragungspunkt. Die Aminosäure-Positionen wurden durch das Anfärben von kalten Aminosäuren als Marker bestimmt, während nicht-färbbare Substanzen (Ac-Leu und Peptide) durch Radioaktivitätsmessungen lokalisiert wurden.

beiden Fragmente unterschieden sich nicht in ihrer Aktivität. In beiden Versuchen wurden ungefähr 0.075 pMol Peptid gefunden, das aus den eingegebenen 7.4 pMol Ac-(^3H)-Leu-tRNS und 4pMol Fragment gebildet wurde.

Um die Möglichkeit der Bildung längerer Peptide zu untersuchen und um festzustellen, ob einige Aminosäuren bevorzugt als Peptidakzeptoren auftreten, wurden Experimente mit gereinigter acetylierter (^3H)-Aminoacyl-tRNS und einem (^3H)-Aminoacyl-tRNS Gemisch unternommen. Die Beladung des tRNS Gemisches erfolgte mit einer äquimolaren Aminosäure-Lösung. Nach Reaktion und Hydrolyse der Peptidyl-tRNS wurden die Komponenten auf einer Biogel-P2 Säule aufgetrennt. Abb. 6 zeigt zwei Elutionsbilder. Es wurde ein Radioaktivitätsgipfel gefunden, der mit der Inkubationszeit zunahm, während sich die im Aminosäure-Gipfel vorhandene Radioaktivität verringerte. Die übrigen Spitzen des Profils blieben auch in Kontrollversuchen gleich und scheinen Spaltprodukte der AA-tRNS darzustellen. Als Kontrollproben wurden Proben verwendet, die entweder keine 50S enthielten oder nicht inkubiert wurden. Es konnten keine schwereren, mit der Inkubationsdauer ansteigenden Radioaktivitätsgipfel beobachtet werden, die auf Translokation und Verlängerung der Peptidkette deuten würden.

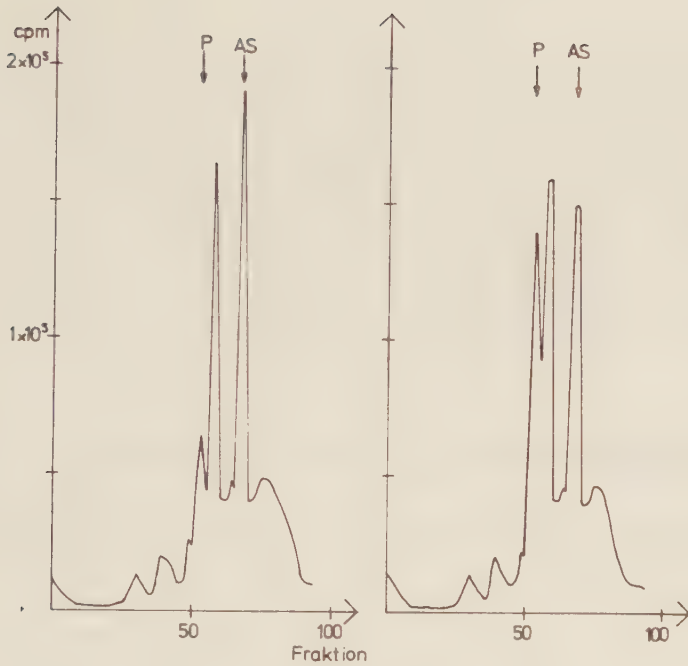


Abb. 6

Elutionsprofil der P2-Säule: Links nach 15 Min. Inkubationszeit, rechts nach 2 Std. Die Pfeile geben die Positionen von Aminosäuren (AS) und Peptiden (P) an.

Peptide aus dem mit der Inkubationszeit ansteigenden Gipfel wurden gesammelt und gespalten. Die Aminosäuren wurden mit kalten Aminosäuren als Marker vermischt und auf einer Dünnschichtplatte getrennt. Nach dem Färben mit Ninhydrin-Lösung wurde die Radioaktivität der einzelnen Flecken bestimmt. Tabelle 3 zeigt die mit Ac-(^3H)-Leu-tRNS^{Leu} als Substrat für die P-Region gewonnenen Ergebnisse.

Tabelle 3

Aminosäuren in zweiter Position von Dipeptiden

Aminosäure	^3H cpm	pMol (in 20-25 pMol Peptid)
Asp	0	0
Glu	378	1.26
Tyr	33	0.26
Gly	639	3.84
Ser	1216	1.19
Ala	224	0.70
Pro	83	0.15
Val, (Thr)	2041	9.50
Phe	893	0.87
His, Arg	190	1.09
Lys	46	0.05
Leu, Ile	15 000	-

In den Peptiden wurden hauptsächlich Valin und Glycin nachgewiesen. In geringerem Ausmaß wurden Glutaminsäure, Serin, Alanin, Phenylalanin und Histidin/Arginin in die Peptide eingebaut. Die restlichen untersuchten Aminosäuren waren nur in Spuren vorhanden. Über Leucin und Isoleucin lassen sich keine Aussagen machen, da die dort gefundene Radioaktivität wohl in erster Linie durch Abspaltung der Acetylgruppe von Ac-(^3H)-Leu hervorgerufen wird.

Mehrere Aminosäuren (Asparagin, Glutamin, Cystein, Tryptophan und Methionin) waren nicht in radioaktiver Form vorhanden. Peptide mit diesen Aminosäuren konnten daher nicht festgestellt werden. Threonin wurde wegen seiner sehr geringen spezifischen Aktivität ebenfalls als nicht radioaktiv betrachtet. Wurden die Peptide vor der Auftrennung nicht gespalten, wurde keine Radioaktivität in den Aminosäureflecken gefunden. Nur im Bereich von Glutaminsäure befand sich eine radioaktive Stelle, die sich jedoch nicht mit der Position der Aminosäure deckte. Die restliche Radioaktivität wurde über den Aminosäuren in der Front des Chromatografie-Puffers gemessen.

Ac-(^3H)-Phe-tRNS^{Phe} erwies sich als Peptiddonor ungeeignet. Auf dem Säulenprofil wurde kein Dipeptidgipfel gefunden. Das Profil war mit dem der Kontrolle identisch.

3.1.3.

tRNS-Puromycin-Test

In diesem Testsystem wurde die Übertragung einer acetylierten Aminosäure von einer Ac-AA-tRNS in der P-Region auf das AA-tRNS Analogon Puromycin in der A-Region gemessen. Zur Katalysierung dieser Reaktion ist die 50S Untereinheit allein in der Lage. Faktoren, 30S Untereinheiten und m-RNS sind nicht notwendig. Die Reaktion wurde mit einer ähnlichen verglichen, bei der ein tRNS-Fragment als Peptiddonor fungierte.

3.1.3.1.

Die Kinetik der Peptidübertragung

Die Kinetik der 50S-katalysierten Peptidübertragung auf Puromycin ist in Abb. 7 dargestellt. Von den untersuchten Substraten erwies sich die gereinigte Ac-(^3H)-Leu-tRNS^{Leu} als der beste Peptiddonor. Die Reaktion mit dem Fragment CACCA-(^3H)-Leu-Ac verlief langsamer. Wurde mit ungereinigter Ac-Leu-tRNS gearbeitet, ließ sich die im Test eingesetzte Radioaktivitätsmenge nicht beliebig erhöhen, wie es bei den gereinigten Substraten möglich war. Daß sehr wahrscheinlich die im Gemisch vorhandene unbeladene tRNS für diesen Effekt verantwortlich ist, konnte in einem Versuch gezeigt werden, in dem gereinigte Ac-Leu-tRNS^{Leu} mit unbeladener tRNS gemischt (Verhältnis 1:40) und im tRNS-Puromycin-Test eingesetzt wurde (Abb. 7).

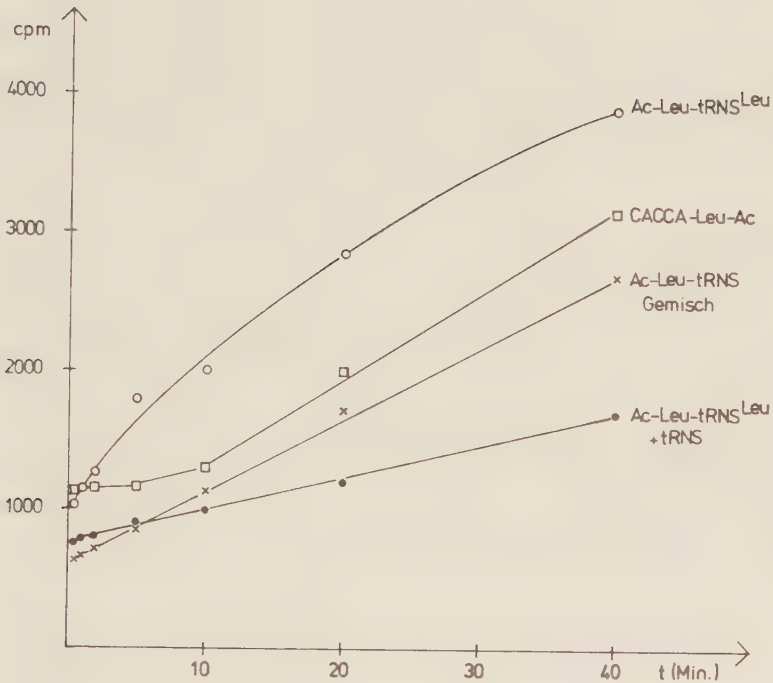


Abb. 7

Kinetik der Peptidübertragung in 50S Untereinheiten mit gereinigter $\text{Ac-Leu-tRNS}^{\text{Leu}}$, Ac-Leu-tRNS (Gemisch), $\text{Ac-Leu-tRNS}^{\text{Leu}}$ (gemischt mit tRNS) oder tRNS-Fragment (CACCA-Leu-Ac) als Donorsubstrat.

Ein Vergleich von $\text{Ac-(}^3\text{H)-Leu-tRNS}^{\text{Leu}}$ mit $\text{Ac-(}^3\text{H)-Phe-tRNS}^{\text{Phe}}$ zeigte auch in diesem Testsystem die schlechte Reaktivität des zweiten Substrates.

Tabelle 4

Ac-AA-Puromycin Bildung

<u>Ac-AA-tRNS</u>	<u>pMol/Ansatz</u>	<u>pMol Ac-AA-PM</u>
$\text{Ac-(}^3\text{H)-Leu-tRNS}^{\text{Leu}}$	3.1	0.233
$\text{Ac-(}^3\text{H)-Phe-tRNS}^{\text{Phe}}$	3.5	0.025

Das im tRNS-Puromycin-Test in 45 Min. gebildete Ac-Aminoacyl-Puromycin (Ac-AA-PM) wurde gemessen.

Aus gleichen Mengen der Substrate wurden sehr unterschiedliche Mengen Ac-Aminoacyl-Puromycin gebildet (Tabelle 4). $\text{Ac-Leu-tRNS}^{\text{Leu}}$ war als Peptiddonor fast zehnmal besser geeignet als $\text{Ac-Phe-tRNS}^{\text{Phe}}$.

3.1.3.2.

Peptidyltransferaseaktivität von 50S LiCl-core-Partikeln

Anstelle von 50S Untereinheiten wurden mit LiCl behandelte core-Partikel eingesetzt und die Kinetik der Peptidyltransferase-Reaktion gemessen. In diesem Experiment wurde mit $\text{Ac-(}^3\text{H)-Leu-tRNS}$ (Gemisch) gear-

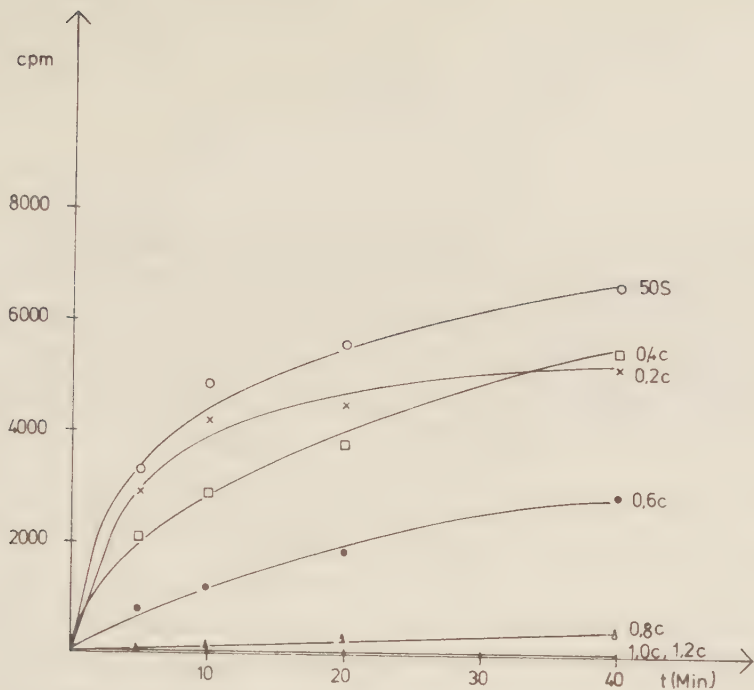


Abb. 8

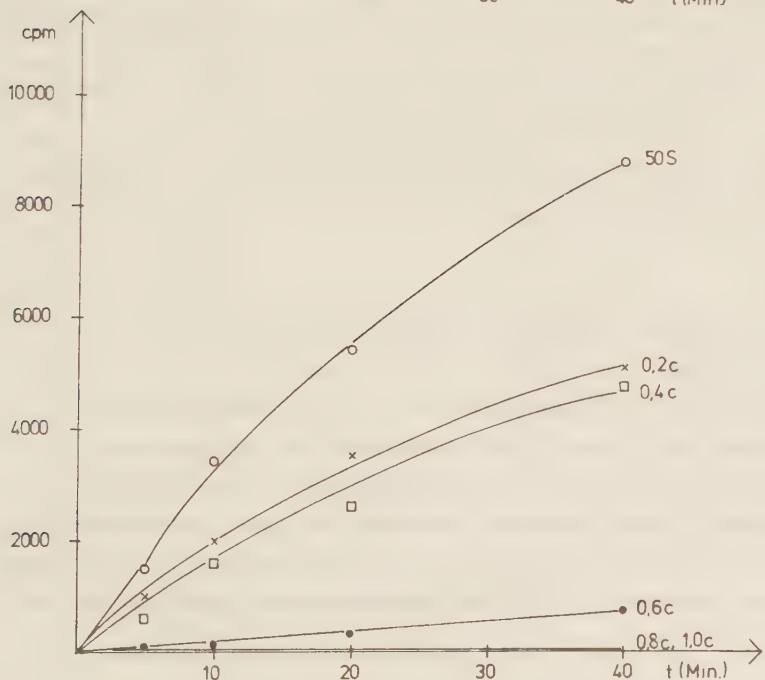


Abb. 9

Kinetik der Peptidübertragung in verschiedenen LiCl core-Partikeln von 50S mit Ac-Leu-tRNA (Abb.8) und

beitet. Abb. 8 zeigt, daß zwei core-Partikel (0.2 core und 0.4 core) etwa 75% der Aktivität der nativen Untereinheit behalten haben. Das 0.6 core besitzt noch 40% der Aktivität. Für das 0.8 core wurden 6% Aktivität gemessen, während 1.0 core und höhermolare core-Partikel inaktiv waren.

Wurde CACCA-(^3H)-Leu-Ac als Peptiddonor verwendet, zeigten 0.2 und 0.4 core nur zwischen 50 und 55% Aktivität (Abb. 9). Als einziges weiteres core-Partikel wies das 0.6 core noch etwa 8% Peptidyltransferaseaktivität auf. Das 0.8 core hatte alle Aktivität verloren. Aus inaktiven core-Partikeln und komplementärer split-Proteinfraktion rekonstituierte Partikel zeigten oft eine mit 50S vergleichbare Aktivität im Fragment-Test, jedoch nur 30 - 40% des Kontrollwertes im tRNS-Puromycin-Test. Die Sensitivität des tRNS-Tests scheint daher größer zu sein.

3.1.4.

tRNS-Fragment Bindung an 50S Untereinheiten

Für die tRNS-Fragment Bindung wurde zuerst der von Celma et al. (1970) beschriebene Test verwendet. In diesem Test werden die Untereinheiten mit Äthanol ausgefällt und zusammen mit dem gebundenen Fragment abzentrifugiert. Der Vergleich der Messung der CACCA-Leu-Ac Bindung in Fällungstest und Gleichgewichtsdia-

alyse (Tabelle 5) zeigt jedoch, daß anscheinend nicht nur spezifisch gebundene Fragmente sedimentiert werden. Obwohl in der Kontrolle keine Präzipitation des Fragments allein beobachtet wurde, scheint beim Ausfällen der Partikel eine Aggregation stattzufinden, die unspezifisch Fragmente mitreißt. Eine Präzipitation von Fragmenten tritt auch dann ein, wenn die Fragmentkonzentration auf 5 μM erhöht wird.

Tabelle 5

CACCA-(^3H)-Leu-Ac Bindung in Fällungstest (FT) und Gleichgewichtsdialyse (GD)

<u>Partikel</u>	<u>% Bindung in FT</u>	<u>% Bindung in GD</u>
-	0 - 1	0
50S	100 = 500 cpm	100 = 320 cpm
0.8 c	66	0
1.2 c	46	0

Daher wurde die Gleichgewichtsdialyse verwendet, und es wurde ausgehend von den Bedingungen des Fragment-Tests die Bindung von CACCA-Leu-Ac weiter optimiert. Als Membran wurde ein Zelluloseacetat-Filter (Schleicher und Schüll, AC 64, Porengröße 0.035 μm) verwendet, der die Einstellung des Gleichgewichts innerhalb von 17 Std. ermöglichte (Abb.10).

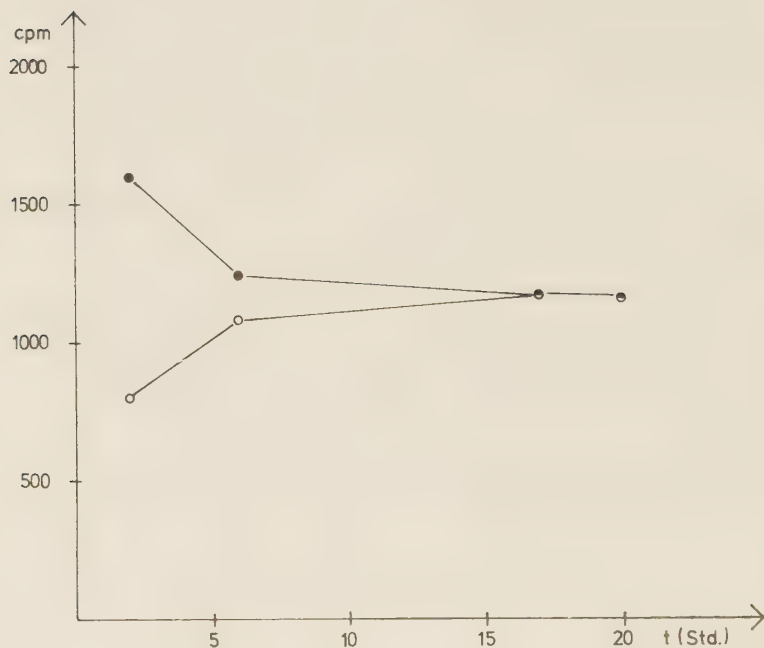


Abb. 10

Einstellung des Gleichgewichts in der Gleichgewichtsdialyse mit CACCA-(^3H)-Leu-Ac bei Verwendung des AC 64-Filters als Dialysemembran. Zu Beginn des Versuches enthielt die eine Kammer (●) etwa 7500 cpm Fragment.

3.1.4.1.

Optimierung der Fragmentbindung

Zuerst wurde festgestellt, welche Salzkonzentrationen für eine optimale Bindung der acetylierten Fragmente notwendig sind. In jeder Optimierungsreihe wurde die Bindung von CACCA-(^3H)-Leu-Ac an 50S Untereinheiten und an 23S RNS gemessen. Abb. 11 zeigt, daß Mg^{++} Ionen unbedingt notwendig für die Fragmentbindung sind, da weder 50S Untereinheiten noch 23S RNS in Abwesenheit von Mg^{++} CACCA-Leu-Ac binden. Die Bindung an 50S und 23S verläuft hier parallel. Die weiteren Versuche wurden bei einer Konzentration von 17 mM MgAc ausgeführt.

Eine hohe Konzentration von monovalenten Ionen ist nicht notwendig. Abb. 12 zeigt eine Optimierungsreihe der KCl-Konzentration, die in Gegenwart von 22 mM NH_4Cl durchgeführt wurde. Sowohl 23S RNS als auch 50S Untereinheiten binden das Fragment bei dieser Konzentration von monovalenten Kationen ohne zusätzliche Gabe von KCl. Die Bindung an die 23S RNS erreicht ein Maximum bei etwa 20 mM KCl und sinkt bei steigenden Konzentrationen ständig ab. Die Bindung an 50S liegt bei 20 mM KCl niedriger als ohne Kaliumionen, steigt jedoch wieder an und erreicht ein Maximum bei 150 mM KCl. Dieses Optimum fehlt in der RNS-Kurve. Auch die 50S-Bindung wird durch höhere KCl-Konzentrationen gehemmt. Als monovalente Kationen wur-

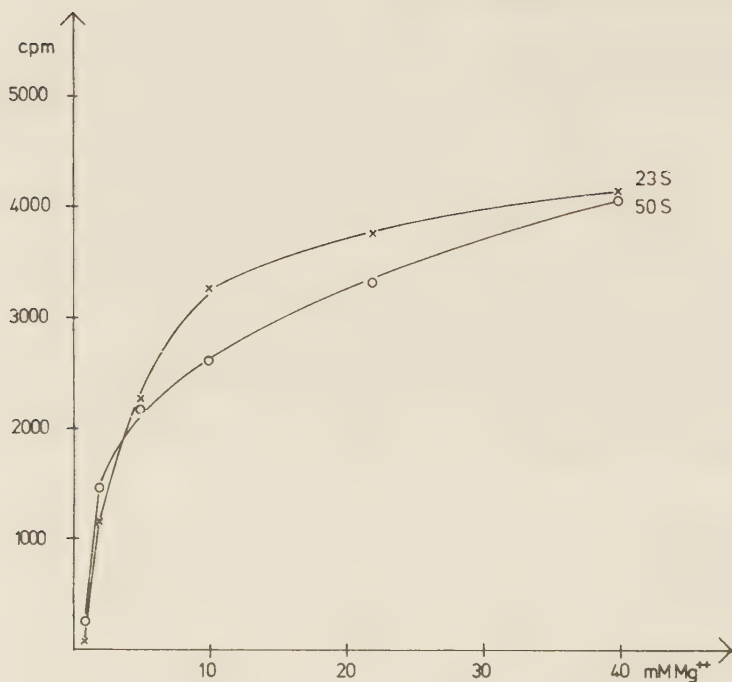


Abb. 11

Bindung von CACCA-(³H)-Leu-Ac an 50S und 23S RNS bei steigenden Mg⁺⁺-Konzentrationen. Der Bindungspuffer enthielt 30 mM Tris-HCl pH 7.2, 250 mM KCl, 22 mM NH₄Cl und 50% Äthanol.

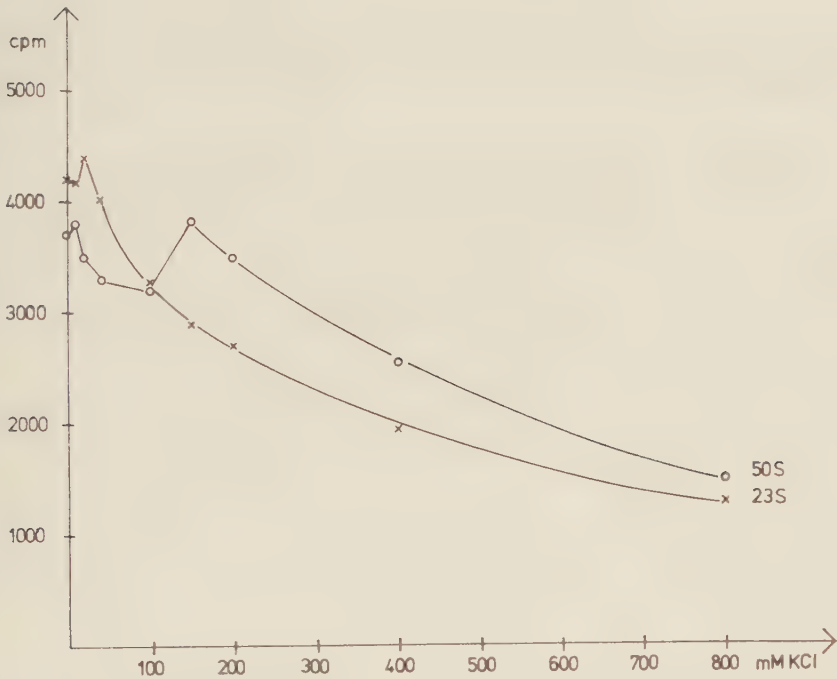


Abb. 12

Bindung von CACCA-(^3H)-Leu-Ac an 50S und 23S RNS bei steigenden KCl-Konzentrationen. Der Bindungspuffer enthielt 30 mM Tris-HCl pH 7.2, 17 mM MgAc, 22 mM NH_4Cl und 50% Äthanol.

den in weiteren Experimenten 22 mM NH_4Cl und 150 mM KCl angeboten.

Die Bindung von CACCA-Leu-Ac an 50S Untereinheiten wird im Neutralbereich ein wenig vom pH des Reaktionsgemisches beeinflusst. Wie Abb. 13 zeigt, wird das Fragment bei pH 7.7 am besten gebunden. Es zeigte sich allerdings, daß das Fragment bei diesem pH auch bei 4°C über 22 Std. nicht stabil war. Die Esterbindung wurde bei nahezu 60% der in die Gleichgewichtsdialyse eingesetzten Fragmente gespalten. So wurde die Gleichgewichtsdialyse bei pH 7.2 durchgeführt, um die Stabilität des Fragments zu gewährleisten. Die CACCA-Leu-Ac Bindung an 23S RNS war im untersuchten pH-Bereich relativ konstant.

Die Fragmentbindung ließ sich auch ohne Äthanol ausführen (Abb. 14), jedoch schwankten die Bindungswerte stark und ließen sich nicht genau reproduzieren. Abb. 14 zeigt den Einfluß von Äthanol und Methanol auf die CACCA-(^3H)-Leu-Ac Bindung. Niedrige Konzentrationen hatten einen hemmenden Effekt, der jedoch bei höheren Alkoholanteilen wieder verschwand. Für die Untersuchungen wurde 50% Äthanol gewählt, obwohl Methanol höhere Bindungsergebnisse brachte. Es wurde mit Methanol unspezifische Bindung an 30S Untereinheiten festgestellt, die mit Äthanol keine Aktivität zeigten. Für die Bindung von CACCA-Leu wurden die Bedingungen von Dietrich et al. (1974) in die Gleich-

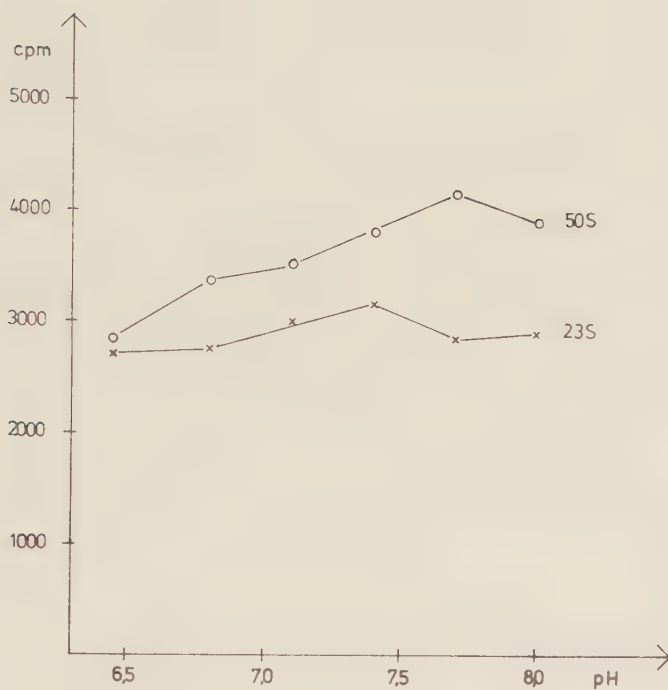


Abb. 13

Bindung von CACCA-(^3H)-Leu-Ac an 50S und 23S RNS bei verschiedenen pH Werten.

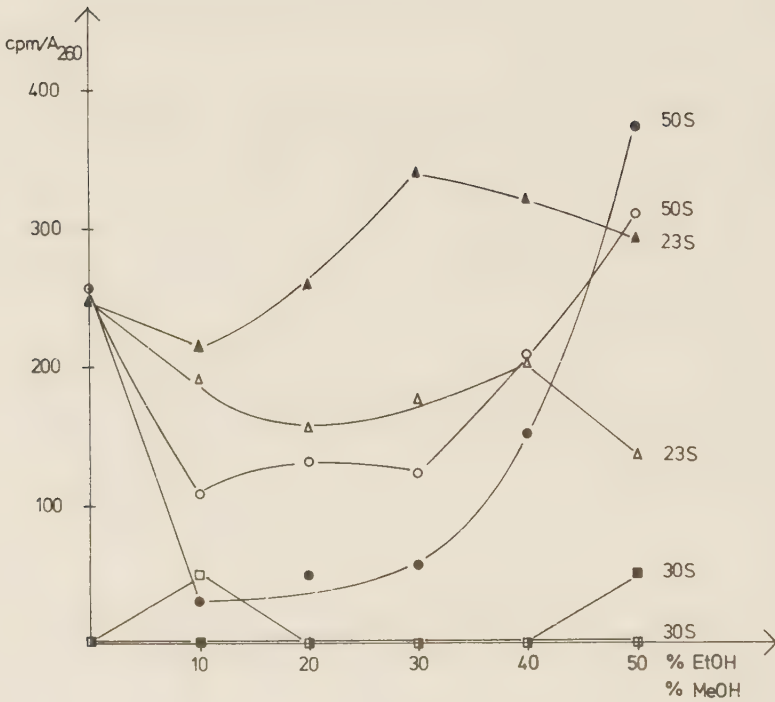


Abb. 14

Bindung von CACCA-(^3H)-Leu-Ac an 50S (o-o), 23S RNS (Δ - Δ) und 30S ($\square$ - $\square$) bei verschiedenen Konzentrationen von Äthanol (o) oder Methanol (•).

gewichtsdialyse übertragen.

3.1.4.2.

Fragmentbindung an 50S LiCl-core-Partikel

Unter den vorher beschriebenen Bedingungen wurden die Bindungsaktivitäten verschiedener 50S core-Partikel getestet. (Abb. 15). Das acetylierte Fragment wird von 0.4 core-Partikeln noch zu etwa 50% gebunden. Das 0.6 core zeigt nur noch schwache Bindung, während 0.8 und 1.2 core inaktiv sind. Werden jedoch mehr Proteine entfernt (2.0 c, 3.0 c, 4.0 c, 23S), steigt die Bindung wieder an. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei 30S core-Partikeln gemacht: Während 30S Untereinheiten keine Bindung zeigen, bewirkt das Abwaschen von Proteinen, daß die core-Partikel (2.0 c, 3.0 c, 4.0 c) das Fragment binden. Die Bindungsaktivität für CACCA-Leu geht den 50S Untereinheiten schon beim Waschen mit 0.4 M LiCl verloren. Auch hier zeigt sich ein Anstieg der Bindung, wenn weitere Proteine entfernt werden.

3.1.4.3.

Konkurrenzversuche mit tRNS, CpCpA, CpA und anderen Fragmenten

Es war eine unterschiedliche Stabilität der Bindungsstellen für die Fragmente CACCA-Leu und CACCA-Leu-Ac gezeigt worden (3.1.4.2.). Zur weiteren Unterschei-

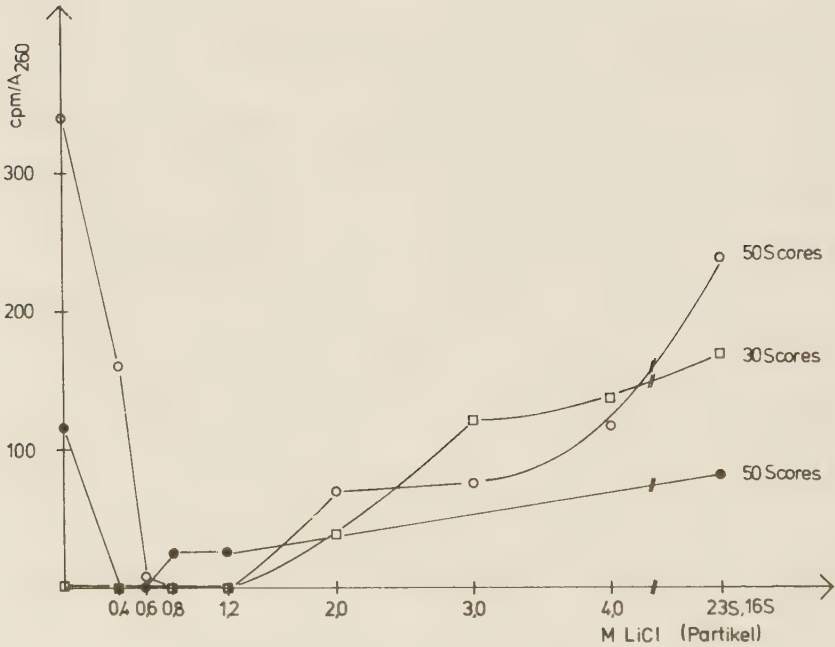


Abb. 15

Bindung von CACCA-(³H)-Leu-Ac (○) und CACCA-(³H)-Leu (●) an 50S, core-Partikel mit abnehmendem Proteingehalt und 23S RNS, sowie von CACCA-(³H)-Leu-Ac an 30S, core-Partikel und 16S RNS (□).

dung dieser Bindungsstellen wurden Konkurrenzversuche mit anderen, an die 50S Untereinheit bindenden Substraten unternommen. Auf Abb. 16 ist die Wirkung von unbeladener tRNS auf die Bindung von CACCA-Leu und CACCA-Leu-Ac zu sehen. Bei einem Verhältnis von 1:1 zwischen tRNS und 50S Untereinheiten im Reaktionsansatz ist die Hemmung der CACCA-Leu-Ac Bindung fast vollständig. Die CACCA-Leu Bindung dagegen wurde durch Zugabe von tRNS stimuliert und erreichte ein Maximum bei einem Verhältnis von 2:1 zwischen tRNS und 50S. Höhere Konzentrationen bewirkten eine leichte Hemmung. Die Bindungsstellen beider Fragmente sind also voneinander deutlich unterschieden. Unbeladene tRNS bindet bevorzugt an die Ribosomenregion, die von CACCA-Leu-Ac besetzt wird.

Um festzustellen, wieviele Nukleotide vom 3'-Ende der tRNS notwendig sind, um zwischen den Bindungsstellen zu unterscheiden, wurden Verdrängungsexperimente mit den Oligonukleotiden CCA und CA gemacht. Abb. 17 zeigt den Einfluß von CCA auf die Bindung der beiden beladenen Fragmente an 50S Untereinheiten. Bis zu einem zehnfachen molaren Überschuß von CCA über 50S ist die CACCA-Leu-Ac Bindung nicht beeinträchtigt. Darüber nimmt sie jedoch rasch ab und ist bei einem 40fachen Überschuß auf Null zurückgegangen. Die CACCA-Leu Bindung wird bei geringem Überschuß an CCA stimuliert. Auch bei einem Verhältnis von 40:1 von CCA zu 50S Untereinheiten liegen die Bindungs-

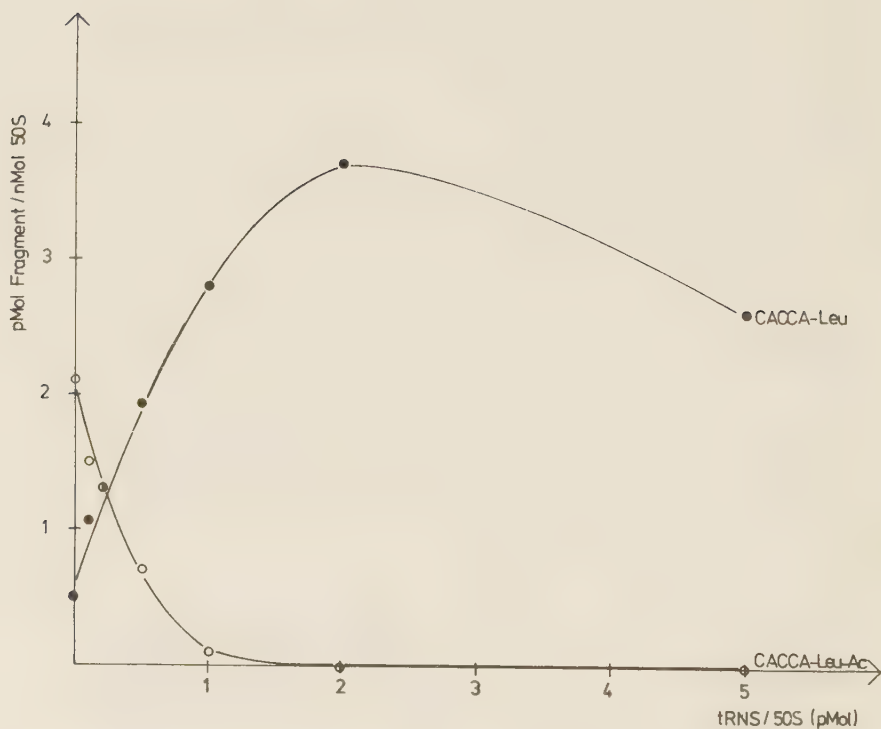


Abb. 16

Bindung von CACCA-(³H)-Leu und CACCA-(³H)-Leu-Ac an 50S Untereinheiten bei Zugabe von steigenden Mengen unbeladener tRNA.

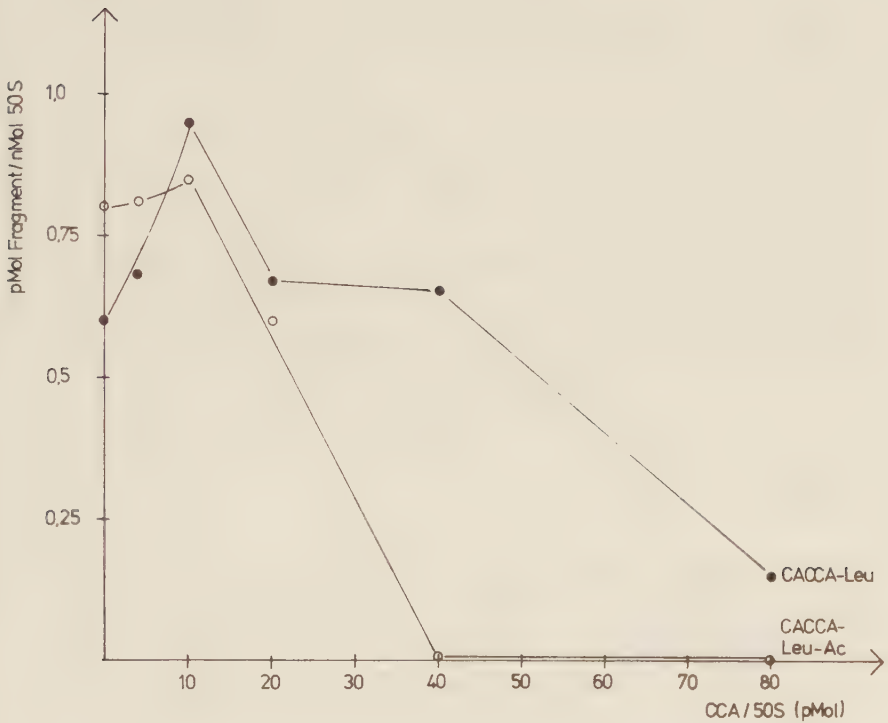


Abb. 17

Bindung von CACCA-(^3H)-Leu und CACCA-(^3H)-Leu-Ac an 50S Untereinheiten bei Zugabe von steigenden Mengen des Oligonukleotids CCA.

werte höher als diejenigen ohne Oligonukleotid-Zugabe. Dann setzt eine Hemmung ein, die aber bei einem Verhältnis von 80:1 noch nicht vollständig ist.

In anderen Versuchen wurde die Bindung von CACCA-Phe an 50S Untereinheiten gemessen. Dieses Fragment wird mehr als zehnmal besser gebunden als CACCA-Leu (3 pMol/nMol 50S bzw. 0.25 pMol/nMol 50S). Die CACCA-Phe Bindung wurde ebenfalls durch tRNS gesteigert, und zwar um über 100%. Die Stimulierung war jedoch nicht so stark wie die der CACCA-Leu Bindung, die 700% betrug. CACCA-Phe wurde aber noch durch CCA-Konzentrationen stimuliert, die mit CACCA-Leu schon eine Hemmwirkung zeigten.

Aus der Abb. 17 geht hervor, daß das Oligonukleotid CCA die P-Region bevorzugt. Wird es in hohen Konzentrationen angeboten, kann es aber auch in der A-Region binden und hier CACCA-Leu verdrängen. Das um ein Nukleotid kürzere CA dagegen unterscheidet nicht zwischen den beiden Bindungsstellen. Beide beladenen Fragmente wurden gehemmt; ihre Bindung konnte jedoch mit den untersuchten CA-Konzentrationen nicht auf Null reduziert werden (Abb. 18).

CACCA-(³H)-Leu-Ac und CACCA-(³H)-Leu wurden in einem Versuch gleichzeitig gebunden. Das Ergebnis war ungefähr eine Addition der Einzelbindungswerte. Eine Un-

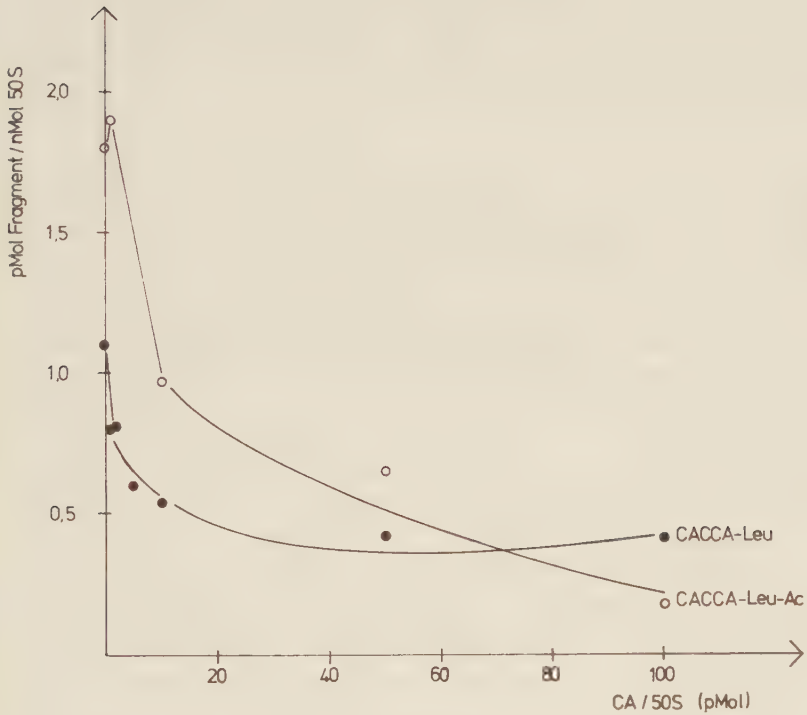


Abb. 18

Bindung von CACCA-(³H)-Leu und CACCA-(³H)-Leu-Ac an 50S Untereinheiten bei Zugabe von steigenden Mengen des Dinukleotids CA.

terscheidung der Bindungsanteile beider Fragmente konnte jedoch nur durch eine Doppelmarkierung erreicht werden. Für diesen Test wurden CACCA-(^3H)-Leu-Ac und CACCA-(^{14}C)-Phe verwendet.

Tabelle 6

Bindung von CACCA-Leu-Ac und CACCA-Phe an 50S Unter-
einheiten (Doppelmarkierung)

System	CACCA-(^3H)-Leu-Ac (pMol/nMol 50S)	CACCA-(^{14}C)-Phe (pMol/nMol 50S)
Total	2.4	23.9
- CACCA-Leu-Ac	-	20.6
- CACCA-Phe	2.5	-
+ CAM (83 μM)	11.6	17.4
+ CCA (83 μM)	0	29.5
+ CAM + CCA	2.4	18.3

Das Totalsystem enthielt 50S, CACCA-(^3H)-Leu-Ac und CACCA-(^{14}C)-Phe.

Tabelle 6 zeigt, daß CACCA-Leu-Ac und CACCA-Phe einander nicht in ihrer Bindung stören. Im Gegenteil, es wird eine leichte Stimulierung der CACCA-Phe Bindung sichtbar, wenn gleichzeitig CACCA-Leu-Ac angeboten

wird. Der oben beschriebene Effekt von CCA kann auch hier beobachtet werden. Auf die Wirkung von Chloramphenicol (Tab. 6) wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

3.1.4.4.

Fragmentbindung und Antibiotika-Wirkung

Der Einfluß von verschiedenen 50S-Antibiotika, die in der Nähe des Peptidyltransferase-Zentrums ihre Bindungsstelle haben, auf die beiden 3'-Fragmente der tRNS, CACCA-Leu-Ac und CACCA-Leu, wurde ebenfalls in der Gleichgewichtsdialyse untersucht. 30S-spezifische Antibiotika (30S-AB) wurden auch getestet, hatten aber, wie Tabelle 7 zeigt, keine Wirkung auf die Bindung der Fragmente an 50S Untereinheiten. Zwei Antibiotika, Chloramphenicol und Erythromycin, üben eine Stimulierung auf die CACCA-Leu-Ac Bindung aus. Sie haben jedoch eine unterschiedliche Wirkung auf die CACCA-Leu Bindung. Diese wird durch Chloramphenicol gehemmt, von Erythromycin aber nicht beeinflusst. Lincomycin hemmt die Bindung beider Fragmente, während Tetracyclin sie im wesentlichen unbeeinflusst läßt. Puromycin übt keine Hemmung auf die CACCA-Leu Bindung aus, obwohl höchstwahrscheinlich nur eine Bindungsstelle für das Antibiotikum und das Fragment vorhanden ist. CACCA-Leu-Ac Bindung kann wegen der stattfindenden Peptidyltransferase-Reaktion in Gegenwart von Puromycin nicht festgestellt werden.

Tabelle 7

Wirkung verschiedener Antibiotika auf die Fragment-
bindung an 50S Untereinheiten

Antibiotikum	CACCA-(³ H)-Leu-Ac (cpm/A ₂₆₀ 50S)	CACCA-(³ H)-Leu (cpm/A ₂₆₀ 50S)
Kontrolle	295	218
CAM (115 µM)	785	75
Ery (50 µM)	430	246
Linc (90 µM)	30	50
PM (80 µM)	0	249
TC (78 µM)	217	224
30S-AB	250-330	180-250

Von jedem Antibiotikum wurden 2.25 µg/Probe eingesetzt. Die verwendeten 30S spezifischen Antibiotika (30S-AB) waren Streptomycin (26 µM), Neomycin (52 µM), Kanamycin (65 µM) und Spectinomycin (110 µM). Für Abkürzungen der anderen Antibiotika siehe Tabelle 2.

Die Wirkung von Chloramphenicol auf die Fragmentbindung wurde genauer untersucht, weil dieses Antibiotikum zur Unterscheidung von acetyliertem und nicht-acetyliertem Fragment dienen kann. Die Auswirkung von steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen auf die CACCA-Leu und CACCA-Leu-Ac Bindung zeigt Abb. 19.

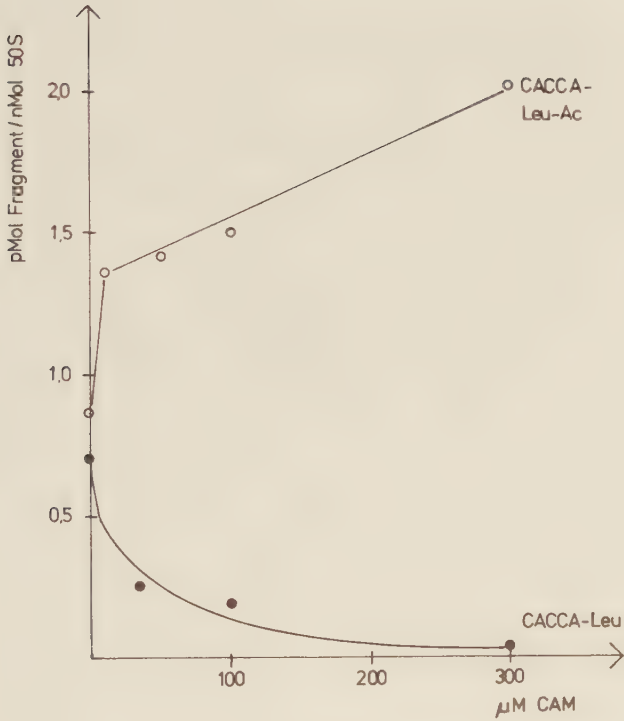


Abb. 19

Bindung von CACCA- (^3H) -Leu und CACCA- (^3H) -Leu-Ac an 50S Untereinheiten bei Zugabe von steigenden Mengen Chloramphenicol (CAM).

Es wurde eine deutliche Stimulierung der CACCA-Leu-Ac Bindung beobachtet, während die CACCA-Leu Bindung gehemmt wurde. Der Chloramphenicol-Effekt wird auch in Tabelle 6 deutlich. Hier bewirkt das Antibiotikum eine Stimulierung der CACCA-Leu-Ac Bindung auf den fünffachen Betrag und wirkt der Hemmung durch CCA entgegen. In dem in Tabelle 6 beschriebenen Versuch konnte durch die Doppelmarkierung die selektive Wirkung von Chloramphenicol (Stimulierung der CACCA-Leu-Ac Bindung, Hemmung der CACCA-Phe Bindung) und von CCA (Hemmung der CACCA-Leu-Ac Bindung, Stimulierung der CACCA-Phe Bindung) nachgewiesen werden.

Um die Bindung des Fragments CACCA-(^{14}C)-Phe zu hemmen, sind höhere Chloramphenicol-Konzentrationen nötig als für die CACCA-Leu Bindung. Wie in Tabelle 6 gezeigt, sind 5 nM/Dialysezelle nicht ausreichend, um 50% Hemmung zu erzielen.

3.1.5.

Affinitätsmarkierung mit CACCA-(^{14}C)-Leu-Ac-Br und (^3H)-Puromycin

CACCA-(^{14}C)-Leu-Ac-Br wurde unter Fragment-Test-Bedingungen mit 50S Untereinheiten und (^3H)-Puromycin inkubiert. Hierbei soll das Fragment über den Bromrest eine kovalente Bindung zu Proteinen oder RNS in einer Position eingehen, in der es mit (^3H)-Puromycin reagieren kann. Nach der Inkubation wurden die 50S Untereinheiten reisoliert, ribosomale Pro-

teine und RNS voneinander getrennt und auf ihren Radioaktivitätsgehalt untersucht. Die gesamte eingebaute Radioaktivität wurde in der Proteinfraction wieder gefunden. Auf einer modifizierten zwei-dimensionalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden die Proteine aufgetrennt. Die Proteinverteilung auf der Gelplatte glich im wesentlichen dem normalen Elektrophoresebild bei pH 8.8 in der ersten Dimension. Auf einigen Platten war L4 nicht zu sehen und L19 wanderte weiter nach rechts als gewöhnlich. Die Proteine L7/L12 waren nicht vorhanden, da es sich um Äthanol-gewaschene Ribosomen handelte, und die beiden Proteine bei dieser Behandlung abgewaschen werden. Die Proteinflecken wurden ausgeschnitten und in Instagel gelöst. Radioaktivität wurde in den Proteinen L32 und L33 gefunden. Diese beiden Flecken enthielten 70 bzw. 250 cpm. Für alle anderen Proteine wurden zwischen 25 und 45 cpm gemessen.

3.2.

Analyse der Wirkungsweise eines Antibiotikums: Pleuromutilin

Die Wirkungsweise von Pleuromutilin, eines Inhibitors der ribosomalen Proteinsynthese, wurde mit den vorher beschriebenen Methoden untersucht.

3.2.1.

In vitro Proteinsynthese

3.2.1.1.

S30-System und R17-RNS-System

Die Proteinsynthese-Systeme mit natürlicher m-RNS, S30-System (E. coli m-RNS) und R17-System (RNS des Phagen R17) werden von Pleuromutilin stark gehemmt. Bei einer Antibiotika-Konzentration von 0.5 μM wird das R17-System zu 50% inhibiert. Für eine 50% Hemmung des S30-Systems ist eine Konzentration von ungefähr 1 μM notwendig (Abb. 20). Zum Vergleich wurde die Wirkung von Chloramphenicol herangezogen: Dieses Antibiotikum hemmt zu etwa 50% bei Konzentrationen von 10 μM (R17) bis 20 μM (S30). Eine vollständige Hemmung konnte nicht beobachtet werden. Auch bei hohen Konzentrationen wurden bei beiden Antibiotika Restaktivitäten zwischen 10% und 20% festgestellt.

3.2.1.2.

Systeme mit künstlicher m-RNS: Poly(A), Poly(C), Poly(U)

Alle drei Systeme werden stärker durch Pleuromutilin als durch Chloramphenicol beeinflusst (Abb. 21). Allerdings ist der Unterschied im Poly(C)-System nicht groß. 50% Hemmung werden hier von 1 μM Pleuromutilin oder von 3 μM Chloramphenicol hervorgerufen. Die Po-

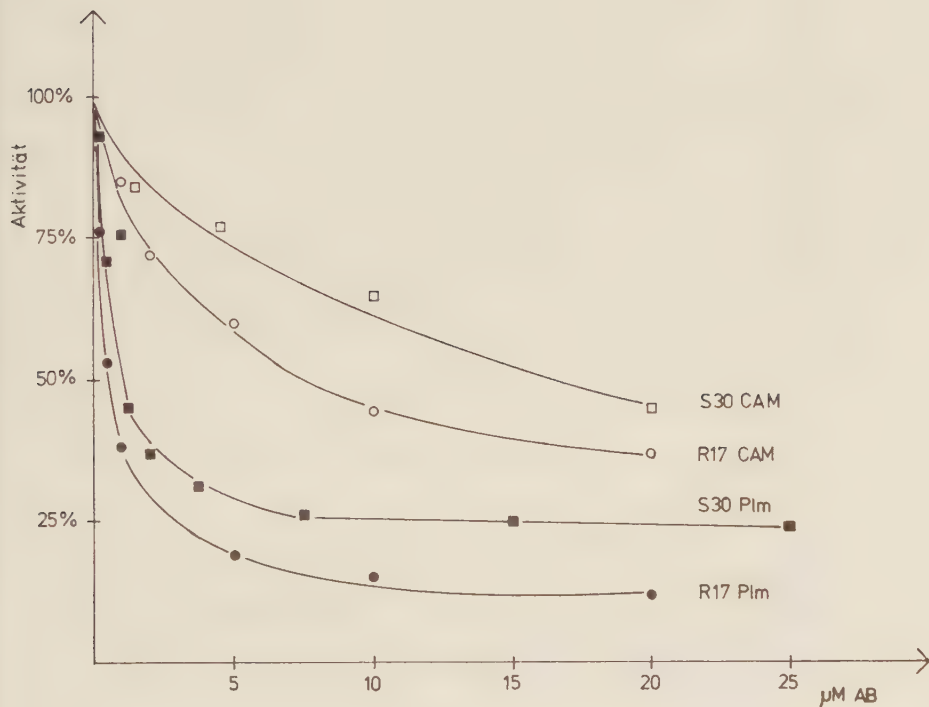


Abb. 20

Hemmung der Proteinsynthese an natürlicher m-RNS durch Chloramphenicol (CAM, o) und Pleuromutilin (Plm, ●) im S30-System ($\square-\square$, 100%=11 285 cpm) und im R17-System ($\circ-\circ$, 100%=5876 cpm).

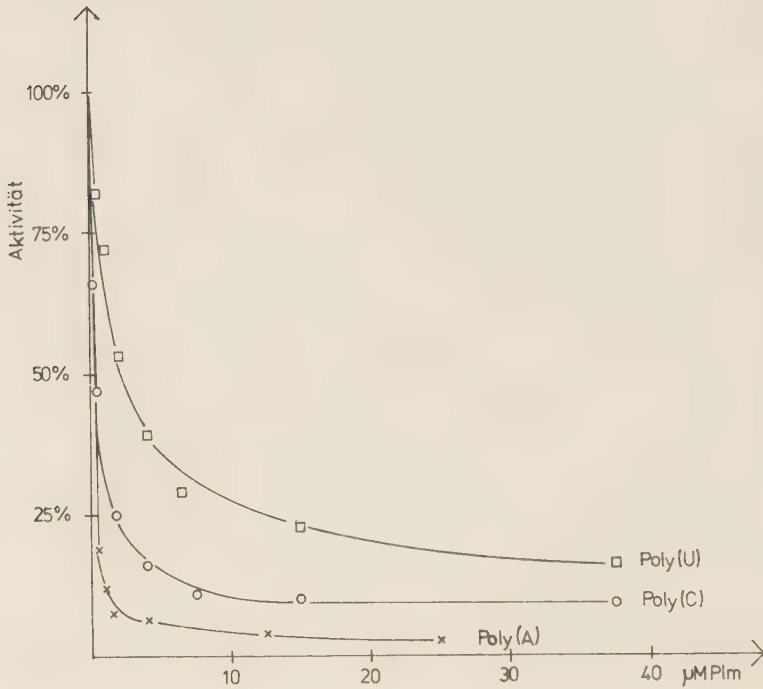


Abb. 21a

Hemmung der Proteinsynthese an künstlicher m-RNS durch Pleuromutilin. Poly(A): 100% = 16 410 cpm. Poly(C): 100% = 9286 cpm. Poly(U): 100% = 80 728 cpm.

ly(Lys)-Synthese, abhängig von Poly(A), ist äußerst empfindlich gegenüber Pleuromutilin (50% bei 0.1 μM); diese Hemmung wird erst durch die 80fache Konzentration (8 μM) an Chloramphenicol erreicht. Das dritte faktorabhängige Proteinsynthese-System, in dem künstliche m-RNS benutzt wird, das Poly(U)-System, wird durch hohe Chloramphenicol-Konzentrationen nur wenig beeinflusst. Selbst 1 mM Chloramphenicol verursacht nur 40% Hemmung. Pleuromutilin dagegen bewirkt eine Hemmung von 50% bei einer Konzentration von 2 μM .

3.2.1.3.

Nichtenzymatische Translation (NET)

In diesem System wird die faktorunabhängige ribosomale Proteinsynthese abhängig von Poly(U) gemessen. Hemmende Antibiotika wirken hier direkt auf die Ribosomen und nicht auf dem Umweg über die Elongationsfaktoren. Das NET-System wird durch Pleuromutilin bei einer Konzentration von 1 μM zu 50% inhibiert (Abb. 22). Bei höheren Konzentrationen (über 50 μM) tritt eine totale Hemmung ein. Das System ist gegenüber Chloramphenicol empfindlicher als das vorher untersuchte Poly(U)-System. Hier rufen 50 μM Chloramphenicol 50% Hemmung hervor.

3.2.2.

tRNS Bindung

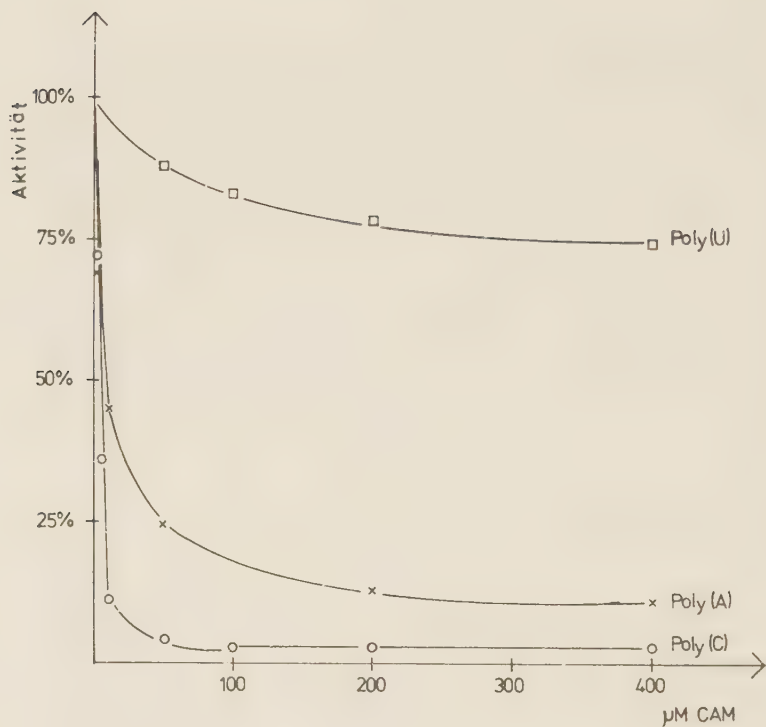


Abb. 21b

Hemmung der Proteinsynthese an künstlicher m-RNS
durch Chloramphenicol.

Um zu untersuchen, ob die Hemmung der Proteinsynthese durch Pleuromutilin durch Störung der tRNS Bindung erfolgt, wurde enzymatische sowie faktorunabhängige Bindung verschiedener tRNS-Spezies an 70S:Poly(U) Komplexe und 50S Untereinheiten in Gegenwart des Antibiotikums durchgeführt. Zum Vergleich wurde in diesen Filter-Tests wieder das Antibiotikum Chloramphenicol verwendet.

Beide Antibiotika hatten keine hemmende Wirkung auf die nicht-enzymatische Phe- oder Ac-Phe-tRNS Bindung an einen 70S·Poly(U) Komplex (Abb. 24). Es war auch keine Pleuromutilin-Wirkung auf die Bindung von Leu- oder Ac-Leu-tRNS an 50S Untereinheiten nachzuweisen (Abb. 23). Eine geringe Hemmung der IF-abhängigen Ac-Phe-tRNS Bindung an den 70S·Poly(U) Komplex wurde beobachtet (Abb. 24). Dagegen wurde die EF-T-abhängige Phe-tRNS Bindung an diesen Komplex durch Pleuromutilin deutlich vermindert (Abb. 25). Während Chloramphenicol auch bei einer Konzentration von 0.5 mM diese Bindung unbeeinflusst ließ, konnte mit Pleuromutilin (7.5 μ M) eine Hemmung um 50% erzielt werden.

Dieser Effekt von Pleuromutilin könnte auf einer Wechselwirkung mit dem Faktor EF-Tu beruhen. Um zu zeigen, ob die Hemmung durch Störung der Bildung von binärem oder ternärem Komplex (Tu·GTP bzw. Tu·GTP·Phe-tRNS) bewirkt wird, wurden die Komplexe von EF-Tu mit (3 H)-GTP untersucht. In einem Filter-Test kann

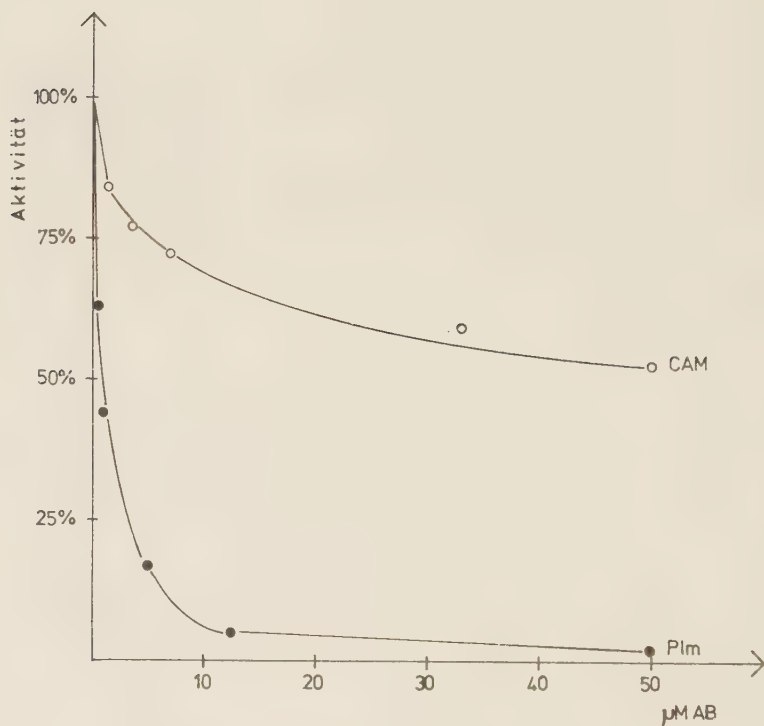


Abb. 22

Hemmung der nicht-enzymatischen Translation (NET)
durch Pleuromutilin (Plm) und Chloramphenicol (CAM).
100% = 3448 cpm.

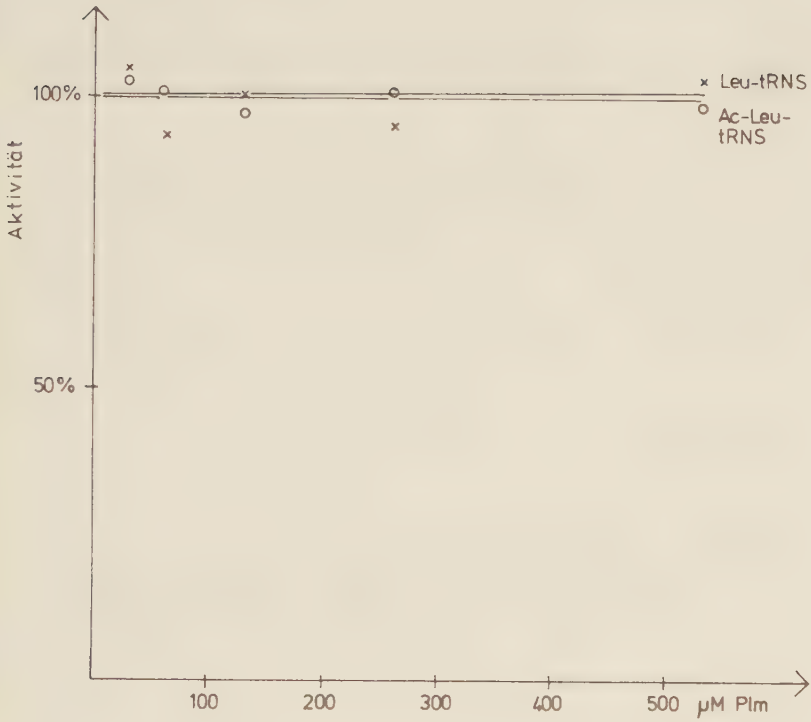


Abb. 23

Bindung von (^3H)-Leu-tRNS (x-x) und Ac-(^3H)-Leu-tRNS (o-o) an 50S Untereinheiten in Gegenwart von Pleuro-mutilin.

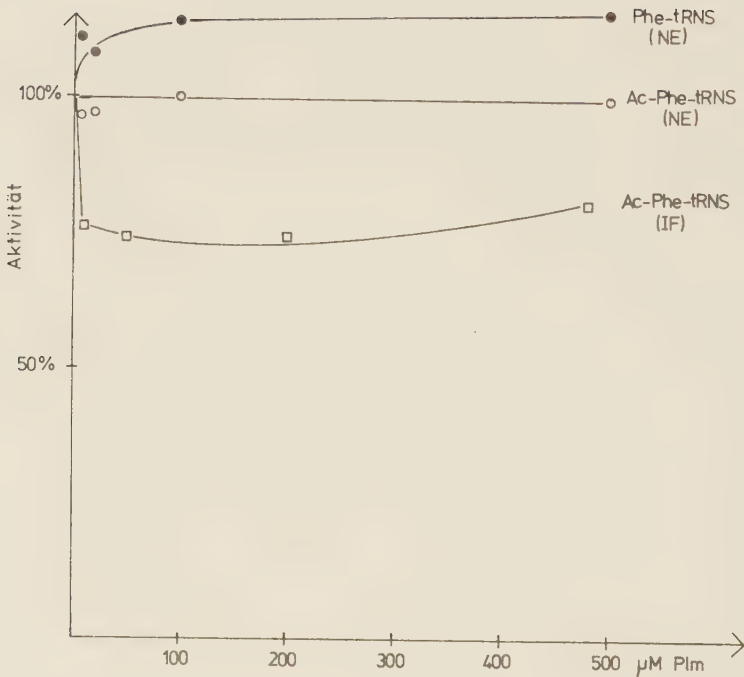


Abb. 24

Nicht-enzymatische (NE) Bindung von (^3H)-Phe-tRNA (100% = 4505 cpm) bei 15 mM Mg^{++} und von Ac-(^3H)-Phe-tRNA (100% = 3347 cpm) bei 5 mM Mg^{++} an einen 70S·Poly(U) Komplex in Gegenwart von Pleuromutilin. IF-abhängige Bindung von Ac-(^3H)-Phe-tRNA an einen 70S·Poly(U) Komplex in Gegenwart von Pleuromutilin (100% = 3962 cpm).

zwischen beiden Komplexen unterschieden werden. Der binäre Komplex bindet an den Filter, während der ternäre sich im Filtrat befindet. Eine Verringerung der EF-Tu•GTP Bildung kann daher direkt gemessen werden.

Tabelle 8

(³H)-GTP Bindung und Phe-tRNS Bindung an EF-Tu

Komplex	Kontrolle (cpm)	+ 200 µM Plm (cpm)
Tu•(³ H)-GTP	50 394	52 049
Tu•(³ H)-GTP-Phe-tRNS	26 131	26 453

Wie Tabelle 8 zeigt, wird die Bildung des binären Komplexes durch Pleuromutilin nicht gehemmt. Auch die in Gegenwart von Phe-tRNS gemessenen Werte sind gleich. Die Hemmung der enzymatischen AA-tRNS Bindung durch Pleuromutilin muß daher auf ribosomaler Stufe erfolgen.

3.2.3.

tRNS-Puromycin-Test und Fragment-Test

Die Übertragung von Ac-Leucin auf Puromycin in der A-Region des Peptidyltransferase-Zentrums wurde mit Fragment (CACCA-Leu-Ac) und Ac-Leu-tRNS als Donorsubstrat untersucht. Beide Reaktionen werden schon durch geringe Pleuromutilin-Konzentrationen gehemmt und

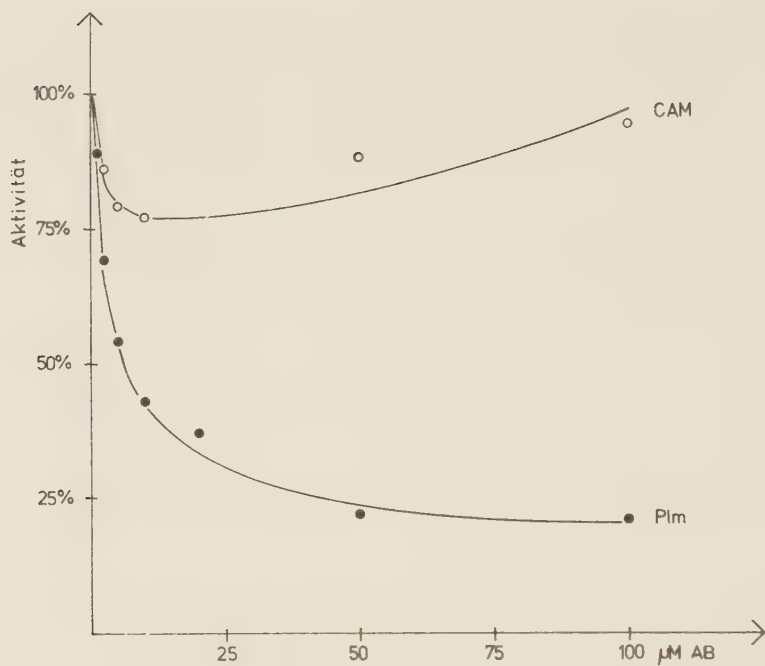


Abb. 25

EF-T abhängige Bindung von (^3H)-Phe-tRNA an einen 70S Poly(U) Komplex in Gegenwart von Pleuromutilin oder Chloramphenicol (100% = 26 278 cpm).

sind zwischen 0.5 und 1 μM zu 50% inhibiert (Abb. 26).

3.2.4.

Fragmentbindung

Als nächstes wurde die tRNS-Fragment Bindung in Gegenwart von Pleuromutilin untersucht. Zum Vergleich wurde Chloramphenicol verwendet, dessen Effekt auf die Fragmentbindung bereits oben beschrieben wurde.

3.2.4.1.

CACCA-Leu und CACCA-Phe

Abb. 27 und Abb.28 zeigen die Wirkung von Pleuromutilin und Chloramphenicol auf die Wechselwirkung der tRNS-Fragmente mit der 50S Untereinheit. Beide Antibiotika rufen eine Hemmung der Bindung der nicht-acetylierten Fragmente hervor. Es ist eine Pleuromutilin-Konzentration von etwa 3-4 μM notwendig, um die CACCA-Leu bzw. CACCA-Phe Bindung um 50% zu reduzieren. Chloramphenicol dagegen wirkt erst bei der 10fachen Menge (50% CACCA-Leu Bindung bei etwa 35 μM) und hat bei dieser Konzentration einen geringeren Effekt auf CACCA-Phe als auf CACCA-Leu.

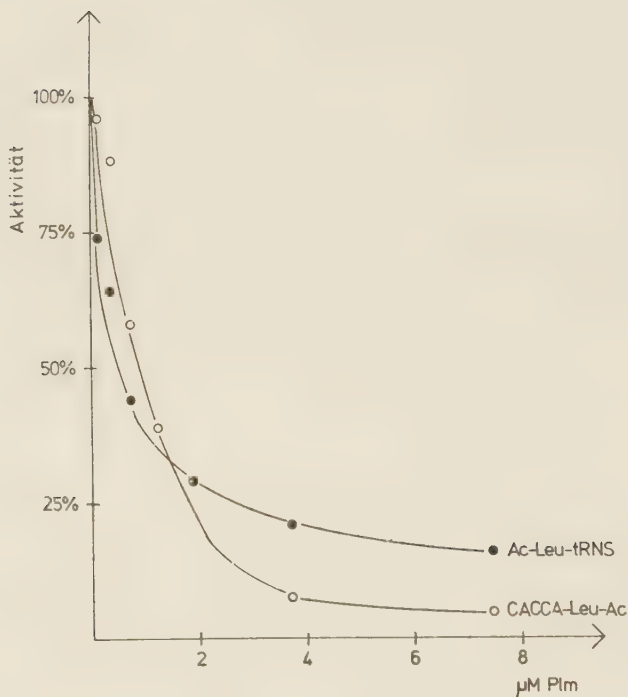


Abb. 26

Hemmung der Peptidyltransferase-Reaktion durch Pleuromutilin im tRNS-Puromycin-Test (●, 100% = 12 693 cpm) und im Fragment-Test (○, 100% = 19 781 cpm).

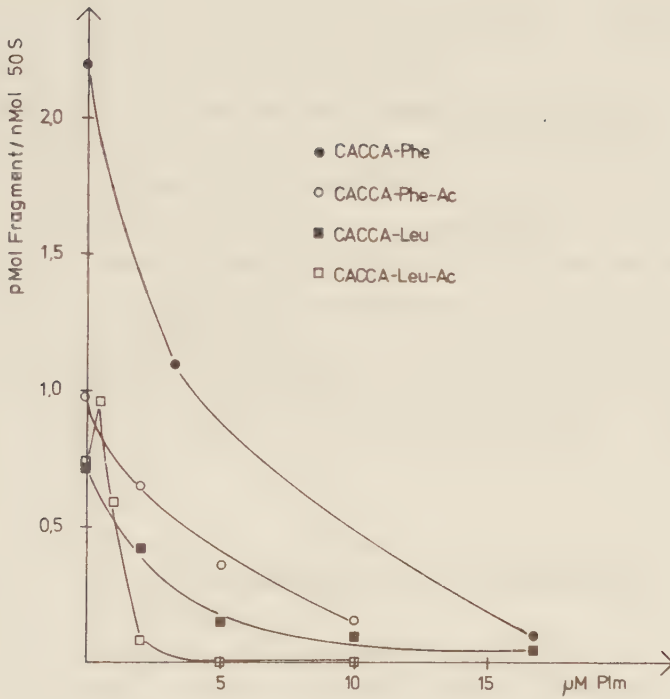


Abb. 27

Bindung verschiedener tRNS-Fragmente an 50S Untereinheiten bei Zugabe von steigenden Konzentrationen Pleuromutilin.

3.2.4.2.

CACCA-Leu-Ac und CACCA-Phe-Ac

Auch diese beiden Fragmente werden durch Pleuromutilin an der Bindung an die 50S Untereinheit gehindert (Abb. 27). 1.5 μM Pleuromutilin ist ausreichend, um die CACCA-Leu-Ac Bindung auf 50% herabzusetzen. Der gleiche Effekt wird durch 3.5 μM Pleuromutilin bei der CACCA-Phe-Ac Bindung erzielt. In Konzentrationsbereichen unter 0.5 μM wurde bei einigen Versuchen eine leichte Stimulierung der CACCA-Leu-Ac Bindung festgestellt. Chloramphenicol übt auf beide Fragmente eine stimulierende Wirkung aus.

3.2.5.

Konkurrenzversuche mit Chloramphenicol und Puromycin

Mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse wurde die Verdrängung von (^{14}C)-Chloramphenicol und (^3H)-Puromycindihydrochlorid durch Pleuromutilin gemessen. Abb. 29 zeigt einen Verdrängungsversuch mit (^3H)-Puromycin und Chloramphenicol bzw. Pleuromutilin. Bei Chloramphenicol-Konzentrationen unter 1 μM wurde eine Stimulierung der Puromycinbindung beobachtet. Im gleichen Konzentrationsbereich bewirkte auch Pleuromutilin eine Steigerung der Puromycinbindung. Während ein hoher Chloramphenicol-Überschuß jedoch zu einer Verminderung der Puromycinbindung führte, konnte ein solcher Effekt für Pleuromutilin innerhalb der unter-

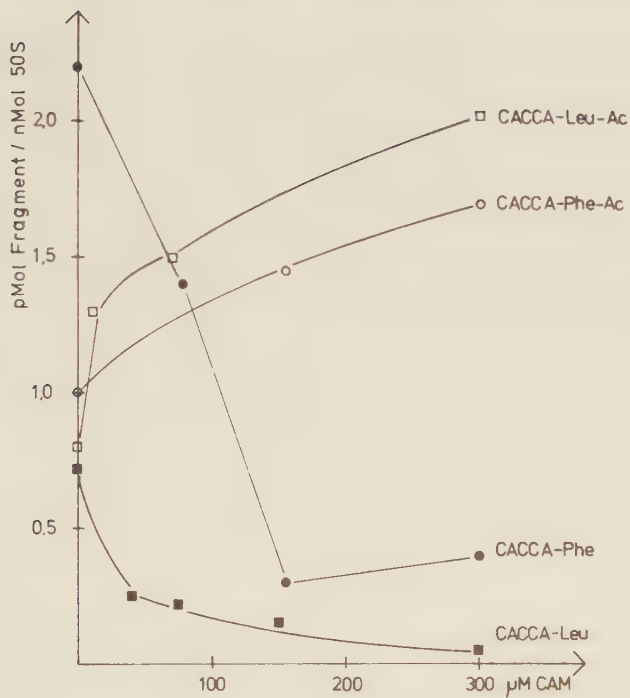


Abb. 28

Bindung verschiedener tRNS-Fragmente an 50S Untereinheiten in Gegenwart von Chloramphenicol.

suchten Konzentrationen nicht festgestellt werden.

Die (^{14}C)-Chloramphenicol Bindung an 50S Untereinheiten wurde durch Fleuromutilin gehemmt. Bei einem molaren Verhältnis von 1 : 2 (Chloramphenicol:Fleuromutilin) wurden nur noch 50% des Kontrollwertes gemessen (Abb. 33). Es blieb jedoch bei allen untersuchten Fleuromutilin-Konzentrationen (bis 30facher Überschuss) eine Restbindung von etwa 10% erhalten.

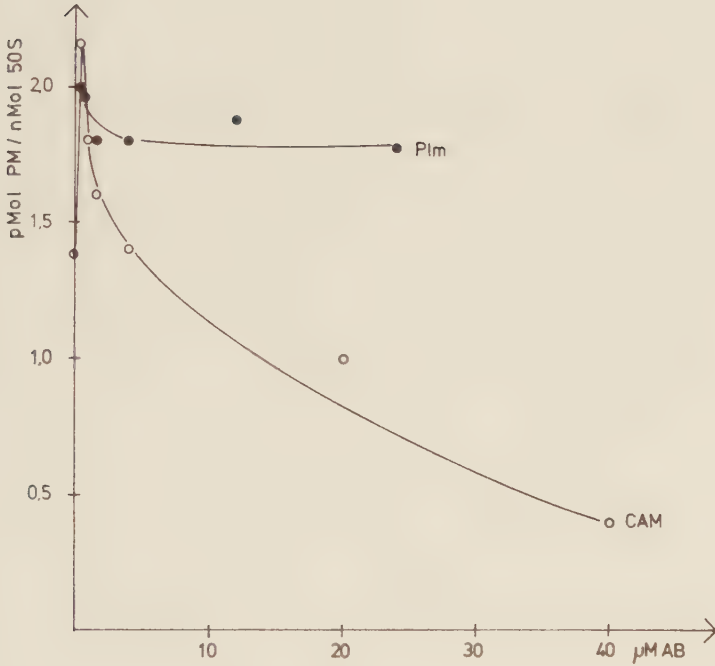


Abb. 29

Konkurrenzversuch mit (^3H)-Puromycin ($0.05 \mu\text{M}$) und Pleuromutilin bzw. Chloramphenicol in der Gleichgewichtsdialyse mit $8 A_{260}$ Einheiten 50S.

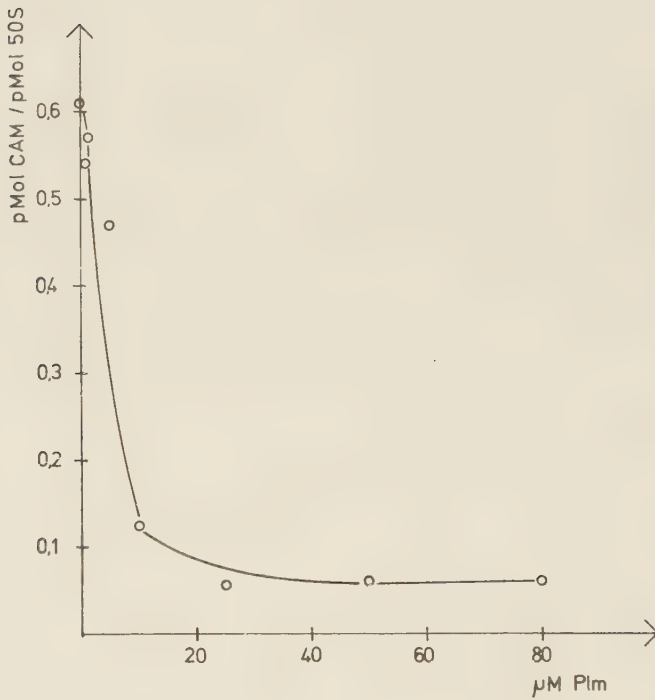


Abb. 30

Konkurrenzversuch mit (^{14}C)-Chloramphenicol (3.33 μM)
und Pleuromutilin in der Gleichgewichtsdialyse mit
8 A_{260} Einheiten 50S.

4.

Diskussion

Der Begriff "Peptidyltransferase-Zentrum" wurde von Monro et al. (1967) für das ribosomale enzymatische Zentrum vorgeschlagen, das die Peptidbindung knüpft. Obwohl es Hinweise gibt, daß die Peptidbindung zwischen einer COOH-Gruppe und einer benachbarten NH_2 -Gruppe spontan entstehen kann, ist am Ribosom ein Enzym nötig, das die Voraussetzung schafft. Da die Peptidyl-tRNS, an die das Peptid über die COOH-Gruppe der letzten Aminosäure kovalent gebunden ist, eine hohe Stabilität aufweist (Sie hat bei pH 9.5 eine Halbwertszeit von 30 Min. bei 37°C; Fraser und Rich, 1973), kann durch eine spontane Auflösung der Esterbindung und anschließende Reaktion mit der Aminogruppe der nächsten Aminosäure auf keinen Fall die Geschwindigkeit der Proteinsynthese (in vivo etwa 15 Aminosäuren pro Sek.) erklärt werden. Auf dem Ribosom muß also ein Enzym existieren, das durch Spaltung der Esterbindung die Carboxyl-Gruppe für die Peptidbindung freimacht. Ob eine aktive Überträgerfunktion vorliegt, ist jedoch noch ungeklärt, da bis jetzt kein Zwischenprodukt, bestehend aus Protein (Enzym) und synthetisierter Peptidkette nachgewiesen werden konnte.

Für den Ablauf der Peptidbindung ist die Bindung von mindestens zwei tRNS-Molekülen nötig, die Donor- und

Akzeptorfunktion erfüllen. Es bestehen jedoch Meinungsverschiedenheiten über die Anzahl der Bindungsstellen am Ribosom, die AA-tRNS aufnehmen können. Für die Bindung von AA-tRNS sind 1, 2 und sogar 3 Bindungsstellen postuliert worden (Kaji et al., 1969; Warner und Rich, 1964; Hardesty et al., 1969; Swan et al., 1969). Jedes Ribosom kann aber nur eine Peptidyl-tRNS binden und zwar je nach Funktionszustand entweder in der P- oder in der A-Region. Nach erfolgreichem Peptidtransfer befindet sich die Peptidyl-tRNS in der A-Region, aus der sie durch den Translokationsschritt, möglicherweise über eine Hybrid-Region (Wettstein und Noll, 1965), in die P-Region verschoben wird, um einer neuen AA-tRNS Platz zu machen.

Sollte es jedoch mehr als eine AA-tRNS Bindungsstelle geben, so ist eine davon von besonderer Bedeutung: Sie muß der P-Region und dem Peptidyltransferase-Zentrum unmittelbar benachbart sein, damit das gebundene Substrat als Peptidakzeptor wirken kann. Diese Bindungsstelle wird von der P-Region dadurch unterschieden, daß das an ihr gebundene Substrat (Peptidyl- oder AA-tRNS) nicht mit dem AA-tRNS Analogon Puromycin reagiert (Yarmolinsky und delaHaba, 1959; Nathans und Neidle, 1963; Symons et al., 1969; Tab.2).

Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene m-RNS unabhängige tRNS Bindungstest an ribosomale Untereinheiten zeigt zwei unterschiedliche Bindungsstellen

an 50S Untereinheiten. In der P-Region wird Ac-Leu-tRNS gebunden, deren Wechselwirkung mit dem Ribosom durch die Antibiotika Chloramphenicol und Erythromycin stimuliert wird (Tab. 2). Die andere Bindungsstelle in der A-Region wird von Leu-tRNS besetzt, deren Bindung durch diese Antibiotika nicht gesteigert werden kann.

An beide Bindungsstellen kann auch nicht-aminoacylierte tRNS binden und die beladene tRNS verdrängen (Abb. 2, Abb. 3). Hierbei hat die Anwesenheit von 30S Untereinheiten keinen Einfluß auf die Verdrängung von Ac-Leu-tRNS aus der 50S Untereinheit. Diese erfolgt, wie Abb. 2 zeigt, aus 70S und 50S in gleicher Weise. Die Zusammenlagerung der Untereinheiten zu 70S Ribosomen ruft jedoch eine Steigerung der Bindung hervor, die weit über die Bindung beider Untereinheiten hinausgeht. Dieser Effekt tritt bei der AA-tRNS Bindung nicht auf. Die Bindung von Phe-tRNS^{Phe} an 70S Ribosomen ist labiler als die an 50S Untereinheiten, wie die Verdrängungskurve auf Abb. 3 zeigt. Die Ursache dafür könnte eine 30S Funktion sein, nämlich die m-RNS abhängige Auswahl der passenden AA-tRNS. Wird eine nicht zum Codon passende AA-tRNS gebunden, muß dieser Mechanismus auch ihre Entfernung zulassen und daher eine lockere Bindung begünstigen.

Auf der 50S Untereinheit bindet die unbeladene tRNS offensichtlich bevorzugt in der P-Region. Ein deut-

licher Hinweis darauf ist das Verhalten der spezifisch in der P- bzw. A-Region bindenden Fragmente CACCA-Leu-Ac und CACCA-Leu. Während tRNS die Bindung des CACCA-Leu Fragments (A-Region) drastisch auf das siebenfache steigern kann, wird die Bindung des CACCA-Leu-Ac Fragments (P-Region) vollständig inhibiert (Abb. 16). Auch wird Ac-Leu-tRNS durch geringere tRNS-Konzentrationen verdrängt als Leu- oder Phe-tRNS. Bei einem Verhältnis von 600 tRNS Molekülen zu einem Ac-Leu-tRNS Molekül wird eine Hemmung der Bindung um 50% erreicht. Für die AA-tRNS beträgt das Verhältnis etwa 800:1. In vivo ist die P-Region eine natürliche Bindungsstelle für unbeladene tRNS, da sich nach jeder neuen Peptidbindung dort die von der Peptidkette befreite tRNS befindet. In der A-Region dagegen bindet nicht-aminoacylierte tRNS nur, wenn ein Mangel an Aminosäuren auftritt, und infolgedessen keine Codon-spezifische tRNS mehr beladen werden kann. Die Bindung der unbeladenen tRNS in die A-Region bedeutet den Abbruch der Peptidkette und ruft in Bakterien, die das rel^+ Gen tragen, die Produktion von ppGpp und pppGpp hervor. Diese Substanzen sind an der Einstellung der RNS-Synthese beteiligt (Cashel und Gallant, 1974).

Auch die 30S Untereinheit kann beide beladenen tRNS Moleküle binden (Abb. 1), wenn auch in geringerem Ausmaß. Die Bindung ist sehr labil und wird schon durch geringe tRNS-Mengen inhibiert (Abb. 2, Abb. 3). Dies könnte darauf hindeuten, daß nur ein kleiner Teil der tRNS für die Wechselwirkung mit der 30S Un-

tereinheit verantwortlich ist (Dube et al., 1969). Möglicherweise sind auch auf der 30S Untereinheit zwei Bindungsstellen für tRNS vorhanden. Dafür spricht, daß die Ac-Leu-tRNS Bindung durch geringere tRNS-Mengen vollständig inhibiert werden kann als die AA-tRNS Bindung. Gestützt wird die Annahme weiterhin durch das unterschiedliche Verhalten von Ac-AA-tRNS und AA-tRNS Bindung gegenüber dem 30S-spezifischen Antibiotikum Streptomycin (Tab. 2), das durch seine Bindung an die 30S Untereinheit ein falsches Ablesen der m-RNS Information (misreading) induziert (Davies et al., 1964, 1965).

Wird die 50S Untereinheit mit LiCl behandelt und dadurch von einigen Proteinen befreit, sinkt die Bindungsaktivität für die beladene tRNS ab (Abb. 4). Das deutet darauf hin, daß Proteine an der Bindung beteiligt sind. Ob sie jedoch die Bindungsstelle bilden oder die rRNS in einer geeigneten Konformation halten, ist unklar. Die Ac-Leu-tRNS Bindung scheint vor allem an 23S RNS zu erfolgen, ohne daß Proteine zur Aufrechterhaltung einer bestimmten Konformation notwendig sind. Dies ist aus Abb. 4 ersichtlich, wonach die Bindungskurve für Ac-Leu-tRNS bei hochgradig proteindefizienten core-Partikeln nicht weiter absinkt, und die Bindung an 23S RNS noch 50% des Ausgangswertes (50S) beträgt. Dagegen scheint die Leu-tRNS Bindung hauptsächlich von Proteinen abhängig zu sein. Wird reine 23S RNS angeboten, so zeigt sich eine stark reduzierte Bindung (16% des Ausgangswertes; Abb. 4).

Da der Bindungstest m-RNS unabhängig ist, kann er mit jeder beliebigen (möglichst gereinigten) AA-tRNS oder Ac-AA-tRNS ausgeführt werden. tRNS-Bindungsproteine können durch Rekonstitution identifiziert werden, ohne daß die Ergebnisse durch Sekundäreffekte, wie Assoziation von 30S und 50S Untereinheiten, beeinflußt werden.

Für die korrekte Funktion der Ribosomen in der Proteinsynthese spielt die m-RNS eine entscheidende Rolle. Es ist vorgeschlagen worden, das Codon als einen allosterischen Effektor zu betrachten, der die Konformation der ribosomalen tRNS-Bindungsstelle oder die Konformation der AA-tRNS so verändert, daß eine optimale Bindung der Codon-spezifischen AA-tRNS erfolgen kann (Woese, 1970; Kurland et al., 1975). Diese Hypothesen wurden aufgestellt, um die große Genauigkeit der Translation zu erklären, die wohl nicht allein durch die Wechselwirkung zwischen Codon und Anticodon bedingt sein kann. Jedoch ist die Assoziationskonstante zweier komplementärer Anticodone (tRNS^{Phe} und tRNS^{Glu}) erstaunlich groß (K_{ass} ist etwa 10^6 M^{-1} ; Grosjean et al., 1976).

Die m-RNS ist aber nicht für das Zustandekommen einer Peptidbindung notwendig. Monro (1969) hat gezeigt, daß 50S Untereinheiten allein in der Lage sind, Peptidbindungen zwischen f-Met und verschiedenen Aminosäuren herzustellen. Als Donor und Akzeptor wurden

f-(³⁵S)-Met-tRNS_f und ein AA-tRNS Gemisch angeboten. Es wurde Di-, Tri- und Tetrapeptide gefunden, die jedoch nicht auf ihre Aminosäurezusammensetzung geprüft wurden.

Die Tatsache, daß Ac-Leu-tRNS ein besserer Peptiddonor ist als Ac-Gly- oder Ac-Phe-tRNS (Mao, 1973), weist darauf hin, daß in der P-Region einer 50S Untereinheit Verhältnisse herrschen, die eine bestimmte N-blockierte AA-tRNS bevorzugen. Für in der A-Region bindende tRNS Fragmente sind unterschiedliche Bindungsstärken nachgewiesen worden (Lessard und Pestka, 1972). Ein m-RNS unabhängiger Einbau der Aminosäuren in Peptide sollte daher für bestimmte Aminosäuren mit größerer Wahrscheinlichkeit erfolgen, wenn die unterschiedliche Bindungsstärke auch für AA-tRNS zutrifft. Wie die Aufstellung in Tab. 3 zeigt, ist das tatsächlich der Fall. Valin wird deutlich bevorzugt in Dipeptide inkorporiert, während Glycin, Glutaminsäure, Serin und Phenylalanin in viel geringerem Maß von der 50S Untereinheit als Peptidakzeptor verwendet werden. Diese Ergebnisse lassen sich nicht mit der Bindungsstärke der entsprechenden 3'-Fragmente korrelieren; es ist jedoch unwahrscheinlich, daß einer Aminosäure bei der Bindung einer vollständigen AA-tRNS die gleiche Bedeutung zukommt, die sie bei der Bindung eines Trinukleotids hat.

Die Bindung der Pentanukleotide CACCA-Leu und CACCA-

Leu-Ac wurde in der Gleichgewichtsdialyse gemessen. Dabei wurde festgestellt, daß die Bindung beider Fragmente vollständig von ribosomalen Proteinen abhängig ist (Abb. 15). Werden diese Proteine durch Waschen der 50S Untereinheiten mit LiCl-Lösung entfernt, verschwindet auch die Bindungsaktivität. Es wurde versucht, die für die Bindung verantwortlichen Proteine mit Hilfe einer Affinitätsmarkierung (CACCA-Leu-Ac-Br) zu bestimmen. Die getroffenen Proteine L32 und L33 liegen zwar in der Nähe der P-Region (Eilat et al., 1974), gehören aber nicht zu der vorher beschriebenen Proteingruppe, da sie noch im 0.8 core-Partikel enthalten sind (Nierhaus et al., 1973).

Eine Behandlung der 50S Untereinheiten mit höhermolekularen LiCl-Lösungen legt Bindungsstellen an der 23S RNS frei, die möglicherweise unspezifisch sind. Die nackte 23S RNS bindet fast ebensoviel Fragment wie die nativen 50S Untereinheiten; diese Bindung erfolgt jedoch wahrscheinlich nicht an einer physiologischen Bindungsstelle. Dafür spricht, daß die natürliche Bindungsstelle an der 50S Untereinheit durch Entfernen von Proteinen zerstört werden kann. Auf unterschiedliche Bindungsstellen an 50S Untereinheiten und rRNS weist auch das Bindungsoptimum bei 150 mM KCl hin, das nur für 50S jedoch nicht für 23S RNS beobachtet wurde (Abb. 12). Unspezifische Bindung von CACCA-Leu-Ac an RNS konnte auch mit der 16S RNS aus 30S Untereinheiten gezeigt werden und ebenso mit 30S core-Partikeln (Abb. 15). Die native 30S Untereinheit

weist keine Bindungsstelle für das Fragment auf.

Durch das Waschen mit LiCl wird der Teil der A-Region, der das 3'-Ende der AA-tRNS aufnimmt, früher zerstört als der entsprechende Teil der P-Region (Abb. 15). Jedoch können Partikel, deren A-Region das Fragment CACCA-Leu nicht mehr bindet, das kleinere Analogon Puromycin noch so ausrichten, daß eine Peptidbindung möglich wird (Abb. 8, Abb. 9). Die Peptidyltransferase-Aktivität aber sinkt im gleichen Maße, in dem die Bindungsaktivität für das Substrat der P-Region (CACCA-Leu-Ac) verloren geht (Abb. 9, Abb. 15). Der Vergleich mit Abb. 9 zeigt, daß dieses Ergebnis nicht auf den Verlust des Peptidyltransferase-Enzyms zurückzuführen ist, sondern auf die Zerstörung der Bindungsstelle für das 3'-Ende der Ac-AA-tRNS. Wird nämlich Ac-Leu-tRNS als Peptiddonor verwendet, ist das 0.8 core-Partikel noch schwach aktiv, während es bei Verwendung von CACCA-Leu-Ac keine Peptidyltransferase-Aktivität mehr zeigt.

Die Abhängigkeit der ribosomalen Aktivitäten von der Konformation des Partikels ist in verschiedenen Versuchen festgestellt worden. So sind vor allem viele Antibiotika als allosterische Effektoren gedeutet worden, die eine aktive oder inaktive Ribosomenkonformation induzieren. Für das Antibiotikum Streptomycin z.B. wurde gezeigt, daß seine Anwesenheit am Ribosom für den induzierten Effekt, die Misinterpretation

des genetischen Codes und die daraus resultierende Bindung der falschen AA-tRNS, nicht erforderlich ist. Ribosomen, die einmal mit Streptomycin in Berührung gekommen sind, behalten die neue Konformation, bis sie durch Waschen mit höheren Salzkonzentrationen in ihre normale Konformation zurückgebracht werden (Garvin et al., 1973). Miskin und Zamir (1974) haben gezeigt, daß die vorübergehende Bindung verschiedener 50S-spezifischer Antibiotika, unter ihnen Erythromycin, Chloramphenicol und Lincomycin, die Peptidyltransferase-Aktivität von 50S Untereinheiten um das zwei- bis fünffache steigern konnte. Für Erythromycin ist dies schon 1972 von Mao und Robinshaw beschrieben worden.

Das stimulierend auf die Peptidyltransferase-Aktivität wirkende Antibiotikum Chloramphenicol ist ein kompetitiver Inhibitor für das AA-tRNS Analogon Puromycin (Pestka, 1970), hat aber auf die Bindung von AA-tRNS keinen oder nur einen geringen Einfluß (Nakamoto et al., 1963). Daraus und aus Verdrängungstests mit AA-tRNS Fragmenten (Celma et al., 1971) wurde geschlossen, daß Chloramphenicol in der A-Region bindet und mit dem 3'-Ende der AA-tRNS oder der Bindung der Aminosäure interferiert. Nierhaus und Nierhaus (1973) konnten zeigen, daß (^{14}C)-Chloramphenicol durch die Oligonukleotide CCA und CA, jedoch nicht durch ein Gemisch von Aminosäuren, verdrängt werden kann. Es wurde festgestellt, daß die Bindung des acetylier-

ten Fragments CACCA-Leu-Ac in Gegenwart von Chloramphenicol (oder Erythromycin) auf das mehrfache gesteigert wird (Celma et al., 1971; Tab. 7; Abb. 19). Die Wirkung von Chloramphenicol ist sehr wahrscheinlich auf eine Konformationsänderung zurückzuführen, die in dem Teil der P-Region auftritt, der das 3'-Ende der Peptidyl-tRNS bindet. Darauf weisen auch die Ergebnisse von Oen et al. (1974) hin, die bei Bindung von Chloramphenicol eine veränderte Reaktivität von Br-Ac-Phe-tRNS mit dem Protein L2 in der P-Region fanden. Da die Ac-Leu-tRNS Bindung nur schwach stimuliert wird (Tab. 2), handelt es sich wahrscheinlich nicht um eine Veränderung der gesamten P-Region.

Chloramphenicol war das einzige in der A-Region bindende Substrat, das eine solche Wirkung auf die P-Region hervorrief. Im Gegensatz dazu hatten alle Substrate der P-Region, die das 3'-Ende der tRNS enthielten, einen stimulierenden Effekt auf die CACCA-Leu oder CACCA-Phe Bindung. Die größte Steigerung wurde durch unbeladene tRNS erzielt, die, wie Abb. 16 zeigt, die CACCA-Leu Bindung auf das siebenfache anheben konnte, während sie die CACCA-Leu-Ac Bindung völlig inhibierte. Diese Stimulierung der Bindung von AA-tRNS Fragmenten wurde bereits von Pestka (1969) beobachtet, jedoch für unspezifisch gehalten, weil sie von mehreren unbeladenen tRNS-Spezies induziert wurde. Wie deutlich zu sehen ist (Abb. 16), bindet tRNS in erster Linie in der P-Region und erst bei höheren Konzentrationen auch in der A-Region. Dieses

spezifische Verhalten der tRNS zeigte sich auch in den Ac-AA-tRNS und AA-tRNS Bindungstests, in denen sich Ac-Leu-tRNS^{Leu} etwas leichter aus der 50S Unter-einheit verdrängen ließ als Phe-tRNS^{Phe}. Eine Stimulierung der Bindung wurde nur für die 3'-Fragmente beobachtet. Eine bessere Bindung der AA-tRNS wurde nicht gefunden. Ebenso wie tRNS hat auch CACCA-Leu-Ac eine stimulierende Wirkung auf die Bindung von CACCA-Phe, die aber schwächer ist als die von der tRNS ausgeübte (Tab. 6). Das Trinukleotid CCA, das dem 3'-Terminus der tRNS entspricht, bewirkt in geringen Konzentrationen eine Stimulation der CACCA-Leu Bindung (Abb. 17). Bei höheren Konzentrationen wurde das Fragment CACCA-Phe noch deutlich stimuliert (Tab. 6), während die Bindung von CACCA-Leu-Ac in der P-Region nach Erreichen einer kritischen Konzentration des Trinukleotids schnell auf Null reduziert wurde (Abb. 17). Das Dinukleotid CA hemmte die Bindung von Fragmenten in A- und P-Region, ohne in niedrigen Konzentrationsbereichen stimulierend zu wirken. Für die Ausführung der tRNS-spezifischen Konformationsänderung und die Erkennung der P-Region muß also mindestens das terminale Trinukleotid (CCA) der tRNS vorhanden sein. CA hat zwar eine Bindungsstelle in der P-Region, wie das Verdrängungsexperiment (Abb. 18) zeigt, jedoch bindet es im Gegensatz zu CCA vermutlich gleich gut in P- und A-Region.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkungsweise des Antibiotikums Pleuromutilin untersucht. Pleuromutilin ist ein sehr wirksamer Hemmstoff der Proteinsynthese. Seine Wirkungsweise wurde mit der von Chloramphenicol verglichen, das ebenfalls mit der Proteinsynthese interferiert und zwar durch Bindung an die A-Region des Peptidyltransferase-Zentrums (Celma et al., 1971; Nierhaus und Nierhaus, 1973). Wie Abb. 20 zeigt, hemmt Pleuromutilin Proteinsynthese-Systeme mit natürlicher m-RNS (*E. coli* bzw. R17 Phage) schon bei viel geringeren Konzentrationen als Chloramphenicol. Die gleiche Auswirkung hat das Antibiotikum auch in Systemen mit künstlicher m-RNS (Abb. 21). Deutliche Unterschiede zur Chloramphenicol-Wirkung können besonders im Poly(U)-System beobachtet werden. Während dieses System (wie auch die beiden anderen) äußerst empfindlich auf die Zugabe von Pleuromutilin reagiert, ist es geradezu resistent gegen die Einwirkung von Chloramphenicol verglichen mit den anderen Systemen.

Gehemmt wurde auch der Peptidyltransferase-Test, in dem die Bildung von Ac-Leu-Puromycin mit CACCA-Leu-Ac oder Ac-Leu-tRNS als Peptiddonor gemessen wurde (Abb. 26). Dabei können die Funktionen der Substratbindung oder die Peptidyltransferase-Aktivität gehemmt werden. Um die genaue Wirkung des Antibiotikums Pleuromutilin in der Proteinsynthese zu analysieren, wurde sein Einfluß auf die enzymatische und

die nicht-enzymatische AA-tRNS Bindung an die Ribosomen untersucht. Da weder die IF-abhängige Ac-Phe-tRNS Bindung noch die nicht-enzymatische Ac-Phe-tRNS Bindung bei 5 mM Mg^{++} beeinflußt wurde, und auch nur geringe Hemmung der Ac-Leu-tRNS Bindung an 50S Untereinheiten beobachtet wurde (Abb. 23, Abb. 24), kann die Wirkung von Pleuromutilin nicht auf einer Hemmung der Ac-AA-tRNS Bindung in der P-Region beruhen. Auf die enzymatische Phe-tRNS Bindung (EF-T abhängig) in der A-Region übt das Antibiotikum eine Hemmung bei höheren Konzentrationen aus (Högenauer, 1974; Abb. 25). Die nicht-enzymatische AA-tRNS Bindung an 70S und 50S Untereinheiten wird auch durch hohe Pleuromutilin-Konzentrationen nicht gehemmt (Abb. 23, Abb. 24). Die für die Hemmung der enzymatischen AA-tRNS Bindung notwendigen Antibiotikum-Konzentrationen liegen wesentlich über den für die Hemmung der Proteinsynthese benötigten Mengen.

Um festzustellen, bei welchem Schritt die Hemmung der AA-tRNS Bindung einsetzt, war es erforderlich, die Vorstufen, nämlich die Komplexe von EF-Tu mit GTP und AA-tRNS in Gegenwart von Pleuromutilin zu messen. Eine Untersuchung der binären und ternären Komplexbildung (EF-Tu·GTP; EF-Tu·GTP·Phe-tRNS) zeigte, daß die EF-Tu abhängige Bindung von Phe-tRNS am Ribosom gehemmt werden muß, da beide Komplexe in Gegenwart von Pleuromutilin normal gebildet werden (Tab. 8). Eine der Wirkung von Kirromycin (Wolf et al., 1974) ver-

gleichbare Wechselwirkung mit dem Elongationsfaktor liegt deshalb nicht vor.

Die Primärwirkung des Antibiotikums kann sich jedoch nicht auf die EF-Tu abhängige AA-tRNS Bindung richten, da NET-System, in dem dieser Faktor fehlt, und Peptidyltransferase-Test, der nur Puromycin und keine AA-tRNS enthält, in gleicher Weise wie die faktorabhängigen Systeme inhibiert werden. Diese Hemmung wird durch geringe Pleuromutilin-Konzentrationen erzielt, die kaum Einfluß auf die EF-Tu abhängige AA-tRNS Bindung haben.

Ausgehend vom Fragment-Test, der nicht nur die Peptidyltransferase-Aktivität der 50S Untereinheiten mißt, sondern auch ihre Fähigkeit, CACCA-Leu-Ac und Puromycin zu binden, wurde die Bindung verschiedener tRNS Fragmente in Gegenwart von Pleuromutilin gemessen. Es zeigte sich, daß das Antibiotikum bereits in geringen Konzentrationen die Wechselwirkung der 3'-Fragmente von Ac-AA-tRNS und AA-tRNS mit der 50S Untereinheit hemmt (Abb. 27). Die Hemmwirkung ist schon in den niedrigen Konzentrationsbereichen stark ausgeprägt, so daß die Hauptwirkung des Antibiotikums auf die Proteinsynthese sehr wahrscheinlich auf eine Displazierung der 3'-Enden von Peptidyl- und AA-tRNS zurückzuführen ist.

Die Wirkung von Pleuromutilin auf die A-Region des

Peptidyltransferase-Zentrums läßt sich noch weiter eingrenzen, wenn man das Antibiotikum Puromycin als ein Analogon der AA-tRNS betrachtet, das nur das terminale Adenosin und eine Aminosäure enthält. Wie Abb. 29 zeigt, wird die Bindung von Puromycin in niedrigen Konzentrationen (bei denen eine Hemmung der Proteinsynthese auftritt) nicht von Pleuromutilin gehemmt. Das Antibiotikum wirkt also nicht auf die Aminosäure oder das terminale Adenosin der AA-tRNS. Die Bindungsstelle für Chloramphenicol dagegen scheint sowohl mit der Puromycin-Bindungsstelle als auch mit der für Pleuromutilin zu überlappen (Abb. 29, Abb. 30). Chloramphenicol kann das 3'-Fragment der AA-tRNS (CACCA-Leu) verdrängen (Abb. 19, Abb. 28), und es gibt Hinweise, daß es mit den Oligonukleotiden CCA und CA konkurriert, durch Aminosäuren jedoch nicht verdrängt wird (Nierhaus und Nierhaus, 1973). Es kann angenommen werden, daß Chloramphenicol mit der Bindung von CCA (mindestens jedoch CA) interferiert. Für Pleuromutilin, das die Bindung von Chloramphenicol und CACCA-Leu verhindert, läßt sich daraus eine Wirkung auf das 3'-Ende der tRNS, mit Ausnahme des terminalen Adenosins und der Aminosäure, ableiten. Ein funktionelles Schema der Pleuromutilinwirkung zeigt Abb. 31.

Wie wird nun diese Wirkung des Antibiotikums erreicht? Bedingt durch die Größe des Moleküls kann zumindest für den Bereich des Peptidyltransferase-Zentrums eine sterische Hemmung postuliert werden. Dagegen

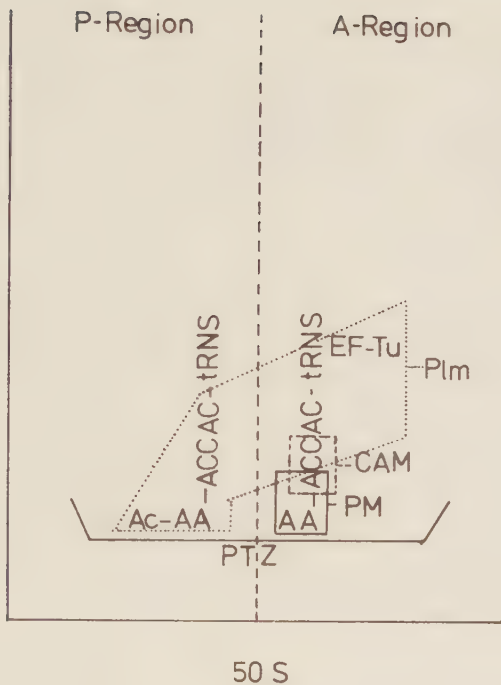


Abb. 31

Wirkungsschema für Pleuromutilin. Eingezeichnet sind die Bindungsstellen von Puromycin (PM, ———), Chloramphenicol (CAM, - - - - -), Peptidyl- und Aminoacyl-tRNS, sowie der Bereich, den die Wirkung von Pleuromutilin umfaßt (Plm, ::::). Die Bindungsstelle von Pleuromutilin befindet sich wahrscheinlich in der A-Region in der Nähe der Chloramphenicol-Bindungsstelle.

spricht, daß durch Oxydation der C11-Hydroxylgruppe (Abb. 32) die Fähigkeit des Moleküls verloren geht, die Proteinsynthese zu hemmen. Die Bindung des Derivats wird durch die Modifikation nicht gestört (Egger und Reinshagen, 1973; Högenauer, 1974). Die verschiedenen Effekte des Antibiotikums, das nur eine Bindungsstelle am Ribosom hat (Högenauer, 1974), lassen sich am besten durch eine Konformationsänderung erklären, die sowohl die P-Region des Peptidyltransferase-Zentrums als auch die Bindungsstelle für den ternären Komplex (EF-Tu·GTP·AA-tRNS) einschließt. Eine Bindung des Antibiotikums in der A-Region ist wahrscheinlich, da die Chloramphenicolbindung durch das sonst inaktive C11-Derivat gehemmt wird (Högenauer, 1974). Eine Überlappung der Pleuromutilin-Region mit der Bindungsstelle für Chloramphenicol ist daher möglich.

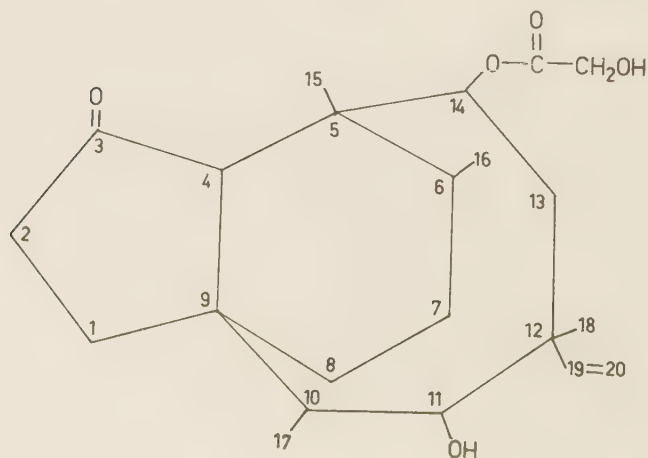


Abb. 32

Strukturformel von Pleuromutilin

Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden neue Methoden zur tRNS- und tRNS Fragment Bindung an Ribosomen und deren Untereinheiten beschrieben und Funktionen des Peptidyl-transferase-Zentrums untersucht.

Es wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, Peptidyl- oder Aminoacyl-tRNS m-RNS unabhängig an ribosomale Untereinheiten zu binden. Mit Hilfe verschiedener Antibiotika wird gezeigt, daß hierbei zwei unterschiedliche Bindungsstellen besetzt werden. Die Peptidyl-tRNS kann mit Puromycin reagieren und bindet daher in der P-Region, während die Aminoacyl-tRNS in der A-Region nicht mit Puromycin reagiert. Unbeladene tRNS hemmt die Bindung der beladenen tRNS Moleküle, bevorzugt aber eindeutig die P-Region, wie durch Verdrängungsversuche mit den spezifisch bindenden Fragmenten CACCA-Leu und CACCA-Leu-Ac nachgewiesen wird.

Es wird gezeigt, daß in der A-Region von 50S Untereinheiten Bedingungen herrschen, die den Einbau bestimmter Aminosäuren (Valin, Glycin) in Dipeptide fördern, wenn die Bindung der AA-tRNS unabhängig von m-RNS erfolgt. Diese Bedingungen werden möglicherweise von den ribosomalen Proteinen geschaffen, die, wie Bindungsversuche mit proteindefizienten core-Partikeln zeigen, an der Bindung von AA-tRNS und Peptidyl-tRNS stark beteiligt sind.

Die Bindung von 3'-Fragmenten der tRNS (CACCA-Leu, CACCA-Leu-Ac) wird in der Gleichgewichtsdialyse, einer sehr sensitiven Methode, untersucht. Es kann gezeigt werden, daß die Bindung der Fragmente an die 50S Untereinheit ausschließlich von Proteinen abhängig ist, und die Bindung verloren geht, wenn diese Proteine durch LiCl entfernt werden. Durch diese Behandlung wird zuerst die Bindungsstelle in der A-Region zerstört, während für die Inaktivierung der P-Region die doppelte Konzentration LiCl notwendig ist.

Bei Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Substrate (Antibiotika, tRNS, CCA, CA) auf die Fragmentbindung in der Gleichgewichtsdialyse werden Hinweise auf Konformationsänderungen gefunden, die durch einige dieser Substrate verursacht werden. So ruft das Antibiotikum Chloramphenicol durch seine Bindung in der A-Region eine Hemmung der CACCA-Leu Bindung an der selben Bindungsstelle hervor, stimuliert jedoch gleichzeitig die Bindung von CACCA-Leu-Ac in der P-Region. Eine schwache Stimulierung durch Chloramphenicol wird auch bei der Peptidyl-tRNS Bindung beobachtet. Verschiedene in der P-Region bindende Substrate (tRNS, CACCA-Leu-Ac, CCA), die miteinander konkurrieren, üben eine stimulierende Wirkung auf die CACCA-Leu Bindung in der A-Region aus. Eine besonders große Steigerung wird in Gegenwart von unbeladener tRNS erzielt.

Die Wirkungsweise des Antibiotikums Pleuromutilin wurde mit verschiedenen Methoden untersucht. Eine Hemmung der Proteinsynthese und der Peptidbindung wurden schon bei sehr geringen Konzentrationen (0.5-3 μM) des Antibiotikums festgestellt. Bei höheren Konzentrationen (8 μM) tritt eine Hemmung der enzymatischen AA-tRNS Bindung auf. Die Hauptwirkung des Antibiotikums scheint sich auf A- und P-Region des Peptidyltransferase-Zentrums zu richten, wo bei Konzentrationen von ca. 2 μM die Bindung von tRNS Fragmenten gehemmt wird. Diese verschiedenen Effekte von Pleuromutilin lassen sich am besten durch eine Konformationsänderung erklären, die das in der A-Region bindende Molekül auf andere Teile der A-Region und auf die P-Region des Peptidyltransferase-Zentrums induziert.

Abkürzungen

Poly(A)	Polyadenylsäure
Poly(C)	Polycytidylsäure
Poly(U)	Polyuridylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
S30	Zellrohextrakt
S150	ribosomenfreie Enzymfraktion
MÄ	Mercaptoäthanol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, DiNa-Salz
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNS	Transfer-RNS
AA-tRNS	Aminoacyl-tRNS
Ac-AA-tRNS	Acetyl-Aminoacyl-tRNS
MES	Morpholinäthansulfonsäure
TCA	Trichloressigsäure
IF	Initiationsfaktoren
EF	Elongationsfaktoren
DTT	Dithiotreitol
EtOH	Äthanol
MeOH	Methanol
PEP	Phosphoenolpyruvat

Literaturverzeichnis

Ballesta, J.P.G.

Elongation Faktor T-Dependent GTP Hydrolysis: Dissociation from Aminoacyl-tRNA Binding

Methods in Enzymology 30, 232 - 235, (1974)

Cashel, M., Gallant, J.

Cellular Regulation of Guanosin Tetraphosphate and Guanosin Pentaphosphate

Ribosomes, Cold Spring Harbour Lab., 733 - 745, (1974)

Celma, M.L., Monro, R.E., Vazquez, D.

Substrate and Antibiotic Binding Sites at the Peptidyltransferase Centre of E. coli Ribosomes

Febs Letters 6, 273 - 277, (1970)

Celma, M.L., Monro, R.E., Vazquez, D.

Substrate and Antibiotic Binding Sites at the Peptidyltransferase Centre of E. coli Ribosomes

Febs Letters 13, 247 - 251, (1971)

Davies, J., Gilbert, W., Gorini, L.

Streptomycin, Suppression and the Code

Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 883 - 890, (1964)

Davies, J., Gorini, L., Davis, B.D.

Misreading of RNA Codewords Induced by Aminoglycoside Antibiotics

J. Mol. Pharmacol. 1, 93, (1965)

Dietrich, S., Schrandt, I., Nierhaus, K.H.

Interdependence of E. coli Ribosomal Proteins at the Peptidyltransferase Centre

Febs Letters 47, 136 - 139, (1974)

Dube, S.K., Rudland, P.S., Clark, B.F.C., Marcker, K.A.

A Structural Requirement for Codon-Anticodon Interaction on the Ribosome

Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 34, 161 -166, (1969)

Egger, H., Reinshagen, H.

Neue Pleuromutiline und Verfahren zu ihrer Herstellung

Ger. Offen. 2.248,237 (Chem. Abstr. 79, 65901v)

Eilat, D., Pellegrini, M., Oen, H., Lapidot, Y.,

Cantor, C.R.

A Chemical Mapping Technique for Exploring the Location of Proteins along the Ribosome-Bound Peptide Chain

J. Mol. Biol. 88, 831 -840, (1974)

Fraser, T.H., Rich, A.

Synthesis and Aminoacylation of a 3'-Amino-3'-desoxy Transfer RNA and its Activity in Ribosomal Protein Synthesis

Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2671 - 2675, (1973)

Funatsu, G., Nierhaus, K.H., Wittmann-Liebold, B.

Ribosomal Proteins XXII. Studies on the Altered Protein

S5 from a Spectinomycin-Resistant Mutant of E. coli
J. Mol. Biol. 64, 201 - 209, (1972)

Gardner, R.S., Wahba, A.J., Basilio, C., Miller, R.S.,
Lengyel, P., Speyer, J.F.
Synthetic Polynucleotides and the Aminoacid Code
Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 2087 - 2094, (1962)

Garvin, R.T., Rosset, R., Gorini, L.
Ribosomal Assembly Influenced by Growth in the Pres-
ence of Streptomycin
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2762 - 2766, (1973)

Gavrilova, L.P., Spirin, A.S.
Stimulation of "Non-Enzymic" Translocation in Ribosomes
by p-Chloromercurybenzoate
Febs Letters 17, 324 -326, (1971)

Gesteland, R.F.
Isolation and Characterisation of Ribonuclease 1
Mutants of E. coli
J. Mol. Biol. 16, 67 - 84, (1966)

Ghosh, H.P., Söll, D., Khorana, H.G.
Studies on Polynucleotides LXVII. Initiation of Protein
Synthesis in vitro as Studied by Using Ribopolynucleo-
tides with Repeating Nucleotide Sequences as Messengers
J. Mol. Biol. 25, 275 - 298, (1967)

Grosjean, H., Söll, D.G., Crothers, D.M.
Studies of the Complex Between Transfer RNAs with Com-
plementary Anticodons
J. Mol. Biol. 103, 499 - 519, (1976)

Haenni, A.C., Chapeville, F.

The Behaviour of Acetylphenylalanine Soluble Ribonucleic Acid in Polyphenylalanine Synthesis
Biochem. Biophys. Acta 114, 135 - 148, (1966)

Hardesty, B., Culp, W., McKeehan, W.

The Sequence of Reactions Leading to the Synthesis of a Peptide Bond on Reticulocyte Ribosomes
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 34, 331 - 345, (1969)

Hardy, S.J.S., Kurland, C.G., Voynow, P., Mora, G.

The Ribosomal Proteins of E. coli. I. Purification of the 30S Ribosomal Proteins
Biochemistry 8, 2897 - 2905, (1969)

Högenauer, G.

The Mode of Action of Pleuromutilin as Compared to Chloramphenicol
Topics in Infectious Diseases 1, ed. Drews and Hahn, 235 - 244, (1974)

Homann, H., Nierhaus, K.H.

Ribosomal Proteins. Protein Composition of Biosynthetic Precursors and Artificial Subparticles from Ribosomal Subunits of E. coli K12
Eur. J. Biochem. 20, 249 - 257, (1971)

Kaji, A., Igarashi, K., Ihitsuka, H.

Interaction of tRNA with Ribosomes. Binding and Release

of tRNA

Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 34, 167 -177,
(1969)

Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G.

Ribosomal Proteins. VII. Two-Dimensional Polyacryl-
amide Gel Electrophoresis for Fingerprinting of Ribo-
somal Proteins

Anal. Biochem. 36, 401 - 412, (1970)

Kurland, C.G., Rigler, R., Ehrenberg, M., Blomberg, C.
Allosteric Mechanism for Codon-Dependent tRNA Selec-
tion on Ribosomes

Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 4248 - 4251, (1975)

Lessard, J.L., Pestka, S.

Studies on the Formation of Transfer Ribonucleic Acid-
Ribosome Complexes

J. Biol. Chem. 247, 6901 - 6908, (1972)

Mao, J.H-C.

Substrate Specificity of E. coli Peptidyltransferase
at the Donor Site

Biochem. Biophys. Res. Comm. 52, 595 - 600, (1973)

Mao, J.H-C., Robinshaw, E.E.

Erythromycin, a Peptidyltransferase Effector
Biochemistry 11, 4864 - 4872, (1972)

Miskin, R., Zamir, A.

Enhancement of Peptidyltransferase Activity by Anti-

biotics Acting on the 50S Ribosomal Subunit

J. Mol. Biol. 87, 121 - 134, (1974)

Monro, R.E., Maden, B.E.H., Traut, R.R.

The Mechanism of Peptide Bond Formation in Protein Synthesis

Symp. Fed. Eur. Biochem. Soc. Academic Press, New York 179, (1967)

Monro, R.E., Marcker, K.A.

Ribosome-Catalysed Reaction of Puromycin with a Formyl-methionine Containing Oligonucleotide

J. Mol. Biol. 25, 347 - 350, (1967)

Monro, R.E.

Protein Synthesis: Uncoupling of Polymerization from Template Control

Nature 223, 903 - 905, (1969)

Monro, R.E., Staehelin, T., Celma, M.L., Vazquez, D.

The Peptidyltransferase Activity of Ribosomes

Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 34, 357 - 368, (1969)

Monro, R.E.

Ribosomal Peptidyltransferase: The Fragment Reaction Methods in Enzymology 20, 472 - 481, (1971)

Nakamoto, T., Conway, T.W., Allende, J.E., Spyrides, G.J., Lipmann, F.

Formation of Peptide Bonds.I. Peptide Formation from Aminoacyl-sRNS

Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 28, 227 -231, (1963)

Nathans, D., Neidle, A.

Structural Requirements for Puromycin Inhibition of Protein Synthesis

Nature 197, 1076 - 1077, (1963)

Nierhaus, K.H., Bordasch, K., Homann, H.E.

Ribosomal Proteins XLIII. In vivo Assembly of E. coli Ribosomal Proteins

J. Mol. Biol. 74, 587 - 597, (1973)

Nierhaus, K.H., Dohme, F.

Total Reconstitution of Functionally Active 50S Ribosomal Subunits from E. coli

Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 4713 - 4717, (1974)

Nierhaus, K.H., Montejo, V.

A Protein Involved in the Peptidyltransferase Activity of E. coli Ribosomes

Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 1931 - 1935, (1973)

Nierhaus, D., Nierhaus, K.H.

Identification of the Chloramphenicol-Binding Protein in E. coli Ribosomes by Partial Reconstitution

Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2224 - 2228, (1973)

Nomura, M., Erdmann, V.A.

Reconstitution of 50S Ribosomal Subunits from Dissociated Molecular Components

Nature 228, 744 - 748, (1970)

Oen, H., Pellegrini, M., Cantor, C.R.

Peptidyltransferase Inhibitors Alter the Covalent
Reaction of BrAcPhe-tRNA with the E. coli Ribosome
Febs Letters 45, 218 - 222, (1974)

Pestka, S.

Studies on the Formation of Transfer Ribonucleic Acid-
Ribosome Complexes. III.

J. Biol. Chem. 243, 2810 - 2820, (1968)

Pestka, S.

Studies on the Formation of Transfer Ribonucleic Acid-
Ribosome Complexes. X.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 589 - 595, (1969)

Pestka, S.

Studies on the Formation of Transfer Ribonucleic Acid-
Ribosome Complexes. IX.

Arch. Biochim. Biophys. 136, 89 - 96, (1970)

Pestka, S., Scolnick, E.M., Heck, B.

A Convenient Assay for Mono-, Di- and Oligophenyl-
alanines

Anal. Biochem. 28, 376 -384, (1969)

Ringer, D., Chládek, S.

Inhibition of Peptidyl Transferase A-site Function by
2'-O-Aminoacyl oligonucleotides

Biochim. Biophys. Res. Comm. 56, 760 - 766, (1974)

Schott, H., Rudloff, E., Schmidt, P., Roychoudhury, R., Kössel, H.

A Dihydroxyboryl-Substituted Methacrylic Polymer for the Column Chromatographic Separation of Mononucleotides, Oligonucleotides and Transfer Ribonucleic Acid
Biochemistry 12, 932 - 938, (1973)

Stadler, H., Wittmann-Liebold, B.

Determination of the Amino Acid Sequence of the Ribosomal Protein S8 of E. coli

Eur. J. Biochem. 66, 49 - 56, (1976)

Swan, D., Sander, S., Bermek, E., Krämer, W., Kreuzer, T., Arglebe, C., Zöllner, R., Eckert, K., Matthaei, H.

On the Mechanism of Coded Binding of Aminoacyl-tRNA to Ribosomes: Number and Properties of Sites

Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 34, 179 - 196, (1969)

Symons, R.H., Harris, R.J., Clarke, L.P., Wheldrake, J.F., Elliot, W.H.

Structural Requirements for Inhibition of Polyphenylalanine Synthesis by Aminoacyl- and Nucleotidyl Analogues of Puromycin

Biochim. Biophys. Acta 179, 248 - 250, (1969)

Traub, P., Nomura, M.

Structure and Function of E. coli Ribosomes. V. Reconstitution of Functionally Active 30S Ribosomal Particles from RNA and Proteins

Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 777 - 784, (1968)

Warner, J.R., Rich, A.

The Number of Soluble RNA Molecules on Reticulocyte Polyribosomes

Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 1134 - 1141, (1964)

Wettstein, F.O., Noll, H.

Binding of Transfer Ribonucleic Acid to Ribosomes Engaged in Protein Synthesis: Number and Properties of Ribosomal Binding Sites

J. Mol. Biol. 11, 35 - 53, (1965)

Woese, C.R.

Codon Recognition: The Allosteric Ribosome Hypothesis

J. Theoret. Biol. 26, 83 - 88, (1970)

Wolf, H., Chinali, G., Parmeggiani, A.

Kirromycin, an Inhibitor of Protein Synthesis that Acts on Elongation Factor Tu

Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 4910 - 4914, (1974)

Yarmolinsky, M.B., delaHaba, G.L.

Inhibition by Puromycin of Amino Acid Incorporation into Protein

Proc. Nat. Acad. Sci. 45, 1721 - 1729, (1959)

Zagorska, L., Dondon, J., Lelong, J.C., Gros, F., Grunberg-Manago, M.

Decoding Site of Initiator Transfer RNA

Biochimie 53, 63 - 70, (1971)

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 1974 bis August 1976 im Max Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin in der Abteilung von Prof. Wittmann durchgeführt.

Ich danke besonders Herrn Dr. Knud H. Nierhaus für seine Anregungen, die nützliche Kritik und die Beratung bei der Durchführung der Experimente, sowie für das Lesen des Manuskriptes.

Ebenso möchte ich den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe danken, insbesondere Herrn Dr. F. Dohme für die Hilfe bei den enzymatischen tRNS Bindungstests, Frau A. Kollak für die Präparation von R17 RNS und Herrn Dr. G. Schreiner für die Durchführung von NET- und Poly(A)-System.

Herrn Dr. Olaf Pongs danke ich für die Herstellung von CACCA-(^{14}C)-Leu-Ac-Br.

Lebenslauf

Name: Beate Ulbrich, geb. Buchhierl
Geboren: 7.6.1951 in Berlin
Schulbildung: 1958-63 Besuch der Grundschule in Berlin-Zehlendorf
1963-70 Besuch der Schadow-Oberschule in Berlin-Zehlendorf
Abitur: Januar 1970
Studium: seit dem Sommersemester 1970 an der Freien Universität Berlin, Fachbereich 23, Biologie
Diplom: 1974
Heirat: 30.7.1972, Norbert Ulbrich
Scheidung: 10.7.1975

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30